

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002 年 11 月 28 日 (28.11.2002)

PCT

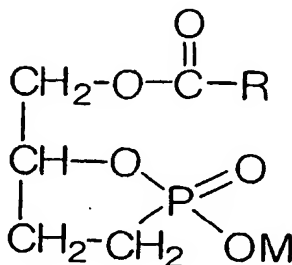
(10) 国際公開番号
WO 02/094286 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 31/662, (MUROFUSHI, Kimiko) [JP/JP]; 〒336-0026 埼玉県さいたま市 辻 4-1 2-1 7 Saitama (JP).
A61P 35/04 // C07F 9/6574
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/04839 (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒104-0031 東京都中央区 京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2002 年 5 月 20 日 (20.05.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願 2001-150685 2001 年 5 月 21 日 (21.05.2001) JP (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ジェンコム (GENCOM CORPORATION) [JP/JP]; 〒194-8511 東京都町田市 南大谷 1 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 向井 睦子 (MUKAI, Mutsuko) [JP/JP]; 〒657-0024 兵庫県神戸市 灘区 楠ヶ丘町 4-2-8-2 0 2 Hyogo (JP). 小林 進 (KOBAYASHI, Susumu) [JP/JP]; 〒152-0032 東京都目黒区 平町 2-1-7 Tokyo (JP). 室伏 擴 (MUROFUSHI, Hiromu) [JP/JP]; 〒336-0026 埼玉県さいたま市 辻 4-1 2-1 7 Saitama (JP). 室伏 きみ子
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CANCEROUS METASTASIS INHIBITORS CONTAINING CARBACYCLIC PHOSPHATIDIC ACID DERIVATIVES

(54) 発明の名称: カルバ環状ホスファチジン酸誘導体を含む癌転移抑制剤

WO 02/094286 A1



(I)

(57) Abstract: The invention aims at providing novel cancerous metastasis inhibitors by examining carbacyclic phosphatidic acid derivatives for inhibitory activity against the infiltration of cancer cells. The invention provides cancerous metastasis inhibitors containing as the active ingredient compounds represented by the general formula (I): (I) wherein R is linear or branched C₁₋₃₀ alkyl, linear or branched C₂₋₃₀ alkenyl, or linear or branched C₂₋₃₀ alkynyl, with the proviso that each group may contain a cycloalkane ring or an aromatic ring; and M is hydrogen or a counter cation.

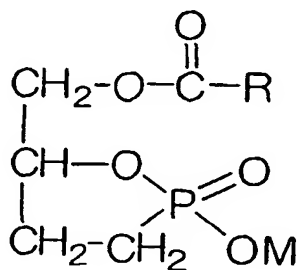
[続葉有]

WO 02/094286 A1



(57) 要約:

本発明の目的は、カルバ環状ホスファチジン酸誘導体について癌細胞の浸潤抑制作用を検討することにより、新規な癌転移抑制剤を提供することである。本発明によれば、一般式 (I) :



(式中、Rは、炭素数 1~30 の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数 2~30 の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数 2~30 の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。M は、水素原子又は対カチオンである。)

で示される化合物を有効成分として含む、癌転移抑制剤が提供される。

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

明細書

カルバ環状ホスファチジン酸誘導体を含む癌転移抑制剤

技術分野

本発明は、カルバ環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含む、癌転移抑制剤に関する。

背景技術

リゾホスファチジン酸 (LPA、lysophosphatidic acid) は、生体膜を構成するリン脂質の中で最も単純な構造を持っており、ホスファチジン酸 (PA) からグリセロールの sn-1 位あるいは 2 位の脂肪酸のどちらか一方が脱アシル化されたものである (図 1)。通常の細胞において、全リン脂質中にしめる LPA の割合は 0.5% 以下ときわめて少なく、1980 年代までは単に、リン脂質生合成の中間体や分解産物としてしか認識されていなかった。しかし最近、LPA の様々な生理活性が示され (Moolenaar, W. H. : Exp. Cell Res. 253, 230-238 (1999))、さらに、細胞膜上の複数の受容体の存在も明らかになって (Guo, Z., 他, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14367-14372 (1996) ; Hecht, J. H., 他, J. Cell Biol. 135, 1071-1083 (1996) ; An, S., 他, J. Biol. Chem. 273, 7906-7910 (1998) ; Bandoh, K., 他, J. Biol. Chem. 274, 27776-27785 (1999) ; 及び Im, D-S., 他, Mol. Pharmacol. 57, 753-759 (2000))、機能リン脂質として注目されるようになった。

LPA は、細胞種によって様々な作用を引き起こす事が知られる。細胞の増殖促進 (van Corven, E. J., 他, Cell 59, 45-54 (1989)) や細胞死の抑制 (Umansky, S. R., 他, Cell Death Diff. 4, 608-616 (1997)) に加え、低分子量 G タンパク質の一つである Rho を介したシグナル伝達系の活性化によって、細胞骨格の変化を導き、繊維芽細胞におけるストレスファイバーの形成 (Gohla, A., 他, J. Biol. Chem. 273, 4653-4659 (1998)) や、神経細胞における神経突起の退縮 (Tigyi, G., 他, J. Biol. Chem. 267, 21360-21367 (1992) ; Jalink, K., 他, Cell Growth & Differ.

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

4, 247-255 (1993) ; Jalink, K., 他, J. Cell Biol. 126, 801-810 (1994) ; 及び Tigyi, G., 他, J. Neurochem. 66, 537-548 (1996))、癌細胞の浸潤(Imamura, F., 他, Biochem. Biophys. Res. Commun. 193, 497-503 (1993) ; O' Connor, K. L., 他, J. Cell Biol. 143, 1749-1760 (1998) ; Stam, J. C., 他, EMBO J. 17, 4066-4074 (1998))などを誘導する。

一方、1992年には、真性粘菌 *Physarum polycephalum* の単相体ミクソアメーバから、真核細胞のDNA複製酵素であるDNAポリメラーゼ α の活性を抑え、動物培養細胞の増殖を抑制する脂溶性物質が見いだされ、単離・精製された(Murakami-Murofushi, K., 他, J. Biol. Chem. 267, 21512-21517 (1992))。この物質はグリセロール骨格の sn-1 位にシクロプロパンを含むヘキサデカン酸が結合し、2位と3位にリン酸が環状エステル結合した物質であることがわかり(図1)、*Physarum* 由来の LPA 様物質であることから、PHYLPA と命名された。

PHYLPA が sn-1 位に特徴的な脂肪酸を有することから、一般的な脂肪酸に置換した誘導体を化学合成し、その活性を検討した。その結果、程度に強弱こそあったが、いずれも細胞増殖を抑制することが示され、PHYLPA の増殖抑制作用が、2位と3位の環状リン酸基によることが明らかになった。現在では、このような環状リン酸基を持つ LPA 類似体を総称して、環状ホスファチジン酸(cPA、cyclic phosphatidic acid)と呼んでいる(図1)。このcPAは最近、ヒト血清中にアルブミンに結合した形で検出され(Kobayashi, T., 他, Life Sciences 65, 2185-2191 (1999))、広く生物界に存在することが明らかになった。また、このとき分離された脂質画分中のcPAは、パルミチン酸を脂肪酸として持つ Pal-cPA が主要成分であった。血清の他、ラットやブタの脳でもcPAの存在が確認され、Tigyi らはまた、ウサギの角膜損傷モデルにおいて、房水や涙腺液中に、cPAを含む一群のLPA類縁体を検出している(Lilom, K., 他, Am. J. Physiol. 274, C1065-C1074 (1998))。

cPA は、LPA と同様な、または相反する様々な生理活性を示すことが明らかになっている。LPA が培養細胞の増殖を促進するのに対し、cPA は抑制作用を示す(Murakami-Murofushi, K., 他, Cell Struct. Funct. 18, 363-370 (1993))。この作

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

用は可逆的であり、培地から cPA を除くと、細胞は再び増殖を始める。増殖抑制作用の機構として、ふたつの可能性が示唆されている。

マウス繊維芽細胞 (NIH3T3) において、cPA が細胞内 cAMP 濃度を数分以内に上昇させることが見いだされている。細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇を妨げることによってこの現象は見られなくなり (Murakami-Murofushi, K., 他, Cell Struct. Funct. 18, 363-370 (1993)), cPA は細胞膜上の受容体を介して Ca^{2+} 依存的なアデニル酸シクラーゼを活性化している可能性が考えられる。細胞内 cAMP 濃度の上昇が MAP キナーゼの活性化を抑制することが示されており (Hordijk, P. L., 他, J. Biol. Chem. 269, 3534-3538 (1994) ; 及び Howe, L. R., 他, J. Biol. Chem. 268, 20717-20720 (1993)), このことが、増殖阻害につながる可能性が示唆された。一方、cPA はその構造上、容易に細胞内に取り込まれると考えられる。この点に関し、sn-1 位を蛍光標識した cPA を合成し、細胞に添加した後にその挙動を観察することで、cPA が迅速に細胞内に移行し、細胞質中、核の周辺部に局在することが判明している。また、cPA が *in vitro* で、細胞周期を制御する cdc25 ホスファターゼの活性を阻害することが見いだされており (小林哲幸・室伏きみ子 : 蛋白質 核酸 酵素 44, 1118-1125 (1999)), このことから、cPA が、細胞膜上の受容体を介さずに、細胞質内で cdk2 キナーゼ複合体の活性化を直接抑制することで、細胞の増殖を阻害している可能性も考えられる。

また、血清を制限した培地で培養した繊維芽細胞では、LPA、cPA 共に、細胞内のアクチン分子によるストレスファイバーの形成を誘導する (小林哲幸・室伏きみ子 : 蛋白質 核酸 酵素 44, 1118-1125 (1999))。この場合は、cPA も LPA と同様に、細胞膜受容体への結合を介して Rho を活性化することで、その作用を引き起こすと考えられる。

さらに、癌細胞の浸潤については、LPA の促進作用に対し、cPA は強い抑制活性を示す (Mukai, M., 他, Int. J. Cancer 81, 918-922 (1999))。

癌の転移は、腫瘍の悪性化を示す最も顕著な現象であり、複雑な過程を経て成立する。中でも浸潤は特徴的なステップであり、生体内で原発巣から遊離した癌

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

細胞は、間質、血管内に浸潤して血流によって運ばれ、血管外、さらに遠隔臓器へと浸潤し、そこで増殖して転移巣を作る。In vitro でこの現象を解析するために、明渡らは、ラット腹水肝癌細胞 (AH-130) をラット腹腔に移植した際におこる腹膜浸潤をモデル化し、宿主正常細胞層を越えた癌細胞の移動を定量的に評価できる実験系を開発した (Akedo, H., 他, Cancer Res. 46, 2416-2422 (1986))。通常、浸潤の研究には細胞外基質をコーティングした膜を通り抜けた癌細胞を観察する実験系が用いられるが、その方法に対してこの系は、in vivo をよく反映すると考えられている。この実験系に用いられるいくつかの癌細胞には、その浸潤に血清を必要とするものとしめないものがある。AH-130 細胞の高浸潤性クローン (MM1) は、その浸潤に血清を必要とし、血清中の浸潤促進物質の検索の結果、少なくともそのうちの 하나가 LPA であることが明らかになった (Imamura, F., 他, Biochem. Biophys. Res. Commun. 193, 497-503 (1993))。このことから、LPA 構造類似体である cPA の浸潤に対する影響を調べたところ、LPA とは全く逆に、浸潤を抑制することが見いだされた。いくつかの、sn-1 位に異なる脂肪酸が結合した誘導体を合成し、その浸潤抑制活性を調べたところ、Pal-cPA が最も強い浸潤抑制を示した。また、同じアッセイ系において、その浸潤に血清や LPA を必要としないヒト繊維肉腫細胞 (HT-1080) の浸潤も、Pal-cPA によって顕著に抑制された (Mukai, M., 他, Int. J. Cancer 81, 918-922 (1999))。

MM1 細胞においても、Pal-cPA の添加によって細胞内 cAMP 濃度は数分のうちに上昇し、LPA 共存下においてもこの効果は失われなかった (Mukai, M., 他, Int. J. Cancer 81, 918-922 (1999))。そこで細胞内 cAMP 濃度を上昇させる試薬を添加したところ、LPA 誘導性の浸潤は抑制された。さらに、これらの試薬や Pal-cPA の添加によって、LPA による Rho の活性が阻害されることが示された (Mukai, M., 他, FEBS Letters 484, 69-73 (2000))。これらのことから、この癌細胞 (MM1) においても、cPA は細胞内 cAMP 濃度を上昇させることによって、cAMP-dependent Protein Kinase A (A キナーゼ) の活性化を介して Rho の活性を阻害し、浸潤を抑制する可能性が示唆された。しかしながら、カルバ環状ホスファチジン酸誘導

PCT/JP02/04839

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

本発明の特に好ましい態様では、一般式 (I) において R は、 $-C_{15}H_{31}$ 、 $-(CH_2)_7CH=CHC_6H_{13}$ 、又は $-(CH_2)_7CH=CHC_8H_{17}$ である。

本発明の特に好ましい態様では、癌細胞の浸潤を抑制することにより癌の転移を抑制する癌転移抑制剤が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、治療的有効量の上記一般式 (I) で示される化合物をヒトを含む哺乳動物に投与することを含む、癌の転移を抑制する方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記一般式 (I) で示される化合物の、癌転移抑制剤の製造における使用が提供される。

図面の簡単な説明

図 1 は、LPA、PHYLPA、及び cPA の構造を示す図である。

図 2 は、化学合成された cPA 誘導体の構造を示す図である。

図 3 は、In vitro 浸潤アッセイ系を示す図である。

(a) In vitro 浸潤アッセイの方法。コンフルエントな状態まで培養した単層正常細胞層に、癌細胞を重層培養し、一定時間後に細胞を固定し、位相差顕微鏡下で観察した。

(b) 浸潤した細胞の、位相差顕微鏡による観察像。矢印で示したものが浸潤した癌細胞 (MM1)。

図 4 は、FBS で誘導した浸潤に対する cPA 誘導体の効果を示す図である。

10%FBS 存在下で 1×10^5 cells/ml の MM1 細胞に $25 \mu M$ の cPA 誘導体を添加し、in vitro 浸潤アッセイを行った。cPA による浸潤抑制作用を、コントロールに対する割合 (%) で示した。

図 5 は、LPA で誘導した浸潤に対する cPA 誘導体の効果を示す図である。

$25 \mu M$ LPA 存在下で 1.5×10^5 cells/ml の MM1 細胞に $25 \mu M$ の cPA 誘導体を添加し、in vitro 浸潤アッセイを行った。cPA による浸潤抑制作用を、コントロールに対する割合 (%) で示した。

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

図 6 は、Carba-cPA の化学合成の経路を示す図である。図中の番号は、実施例 1 の(1-2)に記載した合成の説明中の数字に一致する。

図 7 は、LPA で誘導した浸潤に対する carba-cPA の効果を示す図である。

25 μ M LPA 存在下で 1.5×10^5 cells/ml の MM1 細胞に、0.5 μ M、1 μ M、10 μ M の carba-cPA を添加し、in vitro 浸潤アッセイを行った。carba-cPA による浸潤抑制作用を、コントロールに対する割合 (%) で示した。

図 8 は、MM1 細胞の増殖に対する cPA の効果を示す図である。

10%FBS 存在下で 1×10^4 cells/ml の MM1 細胞に 12.5 μ M、25 μ M の cPA を添加して培養し、24 時間後、72 時間後の細胞数をカウントした。

図 9 は、HT-1080 細胞の浸潤に対する cPA の効果を示す図である。

血清・LPA 非存在下で 2×10^5 cells/ml の HT-1080 細胞に、10 μ M の cPA を添加し、in vitro 浸潤アッセイを行った。cPA による浸潤抑制作用を、コントロールに対する割合 (%) で示した。

図 10 は、LPA で誘導した浸潤に対する cAMP 上昇試薬の効果を示す図である。

25 μ M LPA 存在下で 1.5×10^5 cells/ml の MM1 細胞に、細胞内 cAMP 濃度を上昇させる試薬を図中に示した濃度で添加し、in vitro 浸潤アッセイを行った。それらによる浸潤抑制作用を、コントロールに対する割合 (%) で示した。

図 11 は、細胞内サイクリック AMP に対する cPA の効果を示す図である。

25 μ M cPA を MM1 細胞に添加して一定時間後に反応を止め、細胞内 cAMP 濃度を測定した。

図 12 は、B16 melanoma 血行性肺転移モデルを用いた B16 melanoma の肺転移に対する環状ホスファチジン酸誘導体 cPA-19 及び cPA-20 の抑制作用を調べた実験における各試験群における体重の推移を示す。

図 13 は、B16 melanoma 血行性肺転移モデルを用いた B16 melanoma の肺転移に対する環状ホスファチジン酸誘導体 cPA-19 及び cPA-20 の抑制作用を調べた実験において肺における転移結節数の結果を示す。

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

図 1 4 は、B16 melanoma 血行性肺転移モデルを用いた B16 melanoma の肺転移に対する環状ホスファチジン酸誘導体 cPA-19 及び cPA-20 の抑制作用を調べた実験において病理組織学的検査の結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

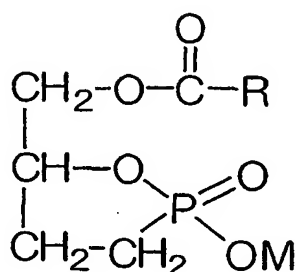
以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。なお、本明細書で使用する略号の説明を以下に記載する。

Ara-	アラキン酸, 20:0
BSA	ウシ血清アルブミン
Bt ₂ cAMP	ジブチリルサイクリック AMP
cAMP	アデノシン 3' , 5' -サイクリックホスフェート
CBM	カルバモイル
cPA	サイクリックホスファチジン酸
CTX	コレラ毒素
DHA	ドコサヘキサエン酸
EPA	エイコサペンタエノン酸 (eicosapentaenoic acid)
FBS	胎児ウシ血清
IBMX	3-イソブチル-1-メチルキサンチン
Lau-	ラウリン酸, 12:0
LPA	リソホスファチジン酸
MEM	最小必須培地
Ole-	オレイン酸, 18:1
Pal-	パルミチン酸, 16:0
ΔPal-	パルミトレイン酸, 16:1
PBS	リン酸緩衝生理食塩水
TCA	トリクロロ酢酸

本発明の癌転移抑制剤は、一般式 (I) :

WO 02/094286

PCT/JP02/04839



(式中、Rは、炭素数 1～30 の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数 2～30 の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数 2～30 の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。Mは、水素原子又は対カチオンである。)

で示されるカルバ環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含む。

一般式 (I) において、置換基Rが示す炭素数 1～30 の直鎖状若しくは分岐状アルキル基の具体例としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、エイコシル基などが挙げられる。

置換基Rが示す炭素数 2～30 の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基の具体例としては、例えば、アリル基、ブテニル基、オクテニル基、デセニル基、ドデカジエニル基、ヘキサデカトリエニル基などが挙げられ、より具体的には、8-デセニル基、8-ウンデセニル基、8-ドデセニル基、8-トリデセニル基、8-テトラデセニル基、8-ペンタデセニル基、8-ヘキサデセニル基、8-ヘプタデセニル基、8-オクタデセニル基、8-イコセニル基、8-ドコセニル基、ヘプタデカ-8, 11-ジエニル基、ヘプタデカ-8, 11, 14-トリエニル基、ノナデカ-4, 7, 10, 13-テトラエニル基、ノナデカ-4, 7, 10, 13, 16-ペンタエニル基、ヘニコサ-3, 6, 9, 12, 15, 18-ヘキサエニル基などが挙げられる。

置換基Rが示す炭素数 2～30 の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基の具体例と

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

しては、例えば、8-デシニル基、8-ウンデシニル基、8-ドデシニル基、8-トリデシニル基、8-テトラデシニル基、8-ペンタデシニル基、8-ヘキサデシニル基、8-ヘプタデシニル基、8-オクタデシニル基、8-イコシニル基、8-ドコシニル基、ヘプタデカ-8, 11-ジイニル基などが挙げられる。

上記のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基に含有されうるシクロアルカン環の具体例としては、例えば、シクロプロパン環、シクロブタン環、シクロペンタン環、シクロヘキサン環、シクロオクタン環などが挙げられる。シクロアルカン環は、1個以上のヘテロ原子を含んでいてもよく、そのような例としては、例えば、オキシラン環、オキセタン環、テトラヒドロフラン環、N-メチルプロリジン環などが挙げられる。

上記のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基に含有されうる芳香環の具体例としては、例えば、ベンゼン環、ナフタレン環、ピリジン環、フラン環、チオフェン環などが挙げられる。

従って、置換基Rがシクロアルカン環によって置換されたアルキル基である場合の具体例としては、例えば、シクロプロピルメチル基、シクロヘキシルエチル基、8, 9-メタノペンタデシル基などが挙げられる。

置換基Rが芳香環によって置換されたアルキル基である場合の具体例としては、ベンジル基、フェネチル基、p-ペンチルフェニルオクチル基などが挙げられる。

一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸(cPA)誘導体中のMは、水素原子又は対カチオンである。Mが対カチオンである場合の例としては、例えば、アルカリ金属原子、アルカリ土類金属原子、置換若しくは無置換アンモニウム基が挙げられる。アルカリ金属原子としては、例えば、リチウム、ナトリウム、カリウムなどが挙げられ、アルカリ土類金属原子としては、例えば、マグネシウム、カルシウムなどが挙げられる。置換アンモニウム基としては、例えば、ブチルアンモニウム基、トリエチルアンモニウム基、テトラメチルアンモニウム基などが挙げられる。

本発明において有効成分として用いる一般式(I)で示される化合物は文献記

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

載の方法 (Kobayashi, S., 他, Tetrahedron Letters 34, 4047-4050 (1993) ; 並びに「日本薬学会 第23回 反応と合成の進歩シンポジウム1997年11月17、18日 (熊本市民会館) 環状ホスファチジン酸およびカルバ体誘導体の合成と生理作用、要旨集ページ101-104」) に準じて合成することができる。具体的な合成経路の一例を図6に示す。

図6においては、先ず、市販の(R)-ベンジルグリシジルエーテル(1)を $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ で活性化させ、メチルホスホン酸ジメチルエステルに $n\text{-BuLi}$ を作用させて得られるリチオ体を反応させることでアルコール(2)を得る。

得られたアルコールを、トルエン中で過剰の *p*-トルエンスルホン酸のピリジニウム塩を用いて 80°C で反応させることにより、環化体(3)を得る。この環化体を、水素雰囲気下で 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2\text{-C}$ を用いて加水素分解し、脱ベンジル化を行う(4)。縮合剤として 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩を用いて、脂肪酸と反応させてカップリング体(5)を得る。次に、求核剤としてプロモトリメチルシランを用いて、メチル基だけを位置選択的に除去し、環状ホスホン酸(6)を得る。これをエーテルを用いて分液ロートに移しこみ、少量の 0.02N の水酸化ナトリウム水溶液を滴下して、分液操作を行い、ナトリウム塩(7)として目的化合物を抽出、精製する。

本発明は、新規な癌転移抑制剤に関する。

癌の転移は癌細胞の原発巣からの離脱に始まり、細胞外マトリックスの破壊、血管内への侵入、血管内皮細胞層を越えての浸潤、遠隔臓器での接着、増殖という多段階の過程をとる。これらの過程には種々の因子が関与しており、それらの阻害物質が新しい癌転移抑制剤として注目されている。中でも、浸潤は転移という現象の最も特徴的なステップであり、癌細胞の浸潤を抑制する物質の中から優れた制癌剤が開発される可能性は極めて高いと考えられる。本発明は、癌細胞の浸潤抑制剤として使用できる新規な癌転移抑制剤を提供するものである。

本発明における癌転移とは、癌細胞がある場所から他の臓器、器官等に移動・増殖すること、即ち、癌細胞が原発巣から離れた部位に移動して癌が形成される

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

ことを意味し、血行性及びリンパ行性の両方を含む。

本発明の癌転移抑制剤により転移を抑制するべき癌の種類は特には限定されず、良性腫瘍及び悪性腫瘍の全てを包含する。転移抑制される癌の具体例としては、悪性黒色腫、悪性リンパ腫、消化器癌、肺癌、食道癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、尿管腫瘍、胆嚢癌、胆管癌、胆道癌、乳癌、肝臓癌、膵臓癌、睾丸腫瘍、上顎癌、舌癌、口唇癌、口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、卵巣癌、子宮癌、前立腺癌、甲状腺癌、脳腫瘍、カボジ肉腫、血管腫、白血病、真性多血症、神経芽腫、網膜芽腫、骨髄腫、膀胱腫、肉腫、骨肉腫、筋肉腫、皮膚癌、基底細胞癌、皮膚付属器癌、皮膚転移癌、皮膚黒色腫などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

癌はその種類により、転移しやすい臓器は少しずつ異なり、例えば、乳癌は肺、肝、骨、リンパ節に、胃癌では肝、肺、骨、副腎に、そして大腸癌では肝、肺、副腎などに高率に転移することが知られている。転移癌の例としては、転移性肝癌、転移性空腸癌、転移性骨腫瘍、転移性脳腫瘍、転移性肺腫瘍、皮膚転移癌、転移性肋骨腫瘍、転移性卵巣癌等がある。従って、本発明の癌転移抑制剤は、このような癌転移を抑制するために使用することができ、特に、術後の転移抑制剤として有用な薬剤である。また、本発明の癌転移抑制剤は、臨床的には癌再発抑制剤でもあり、患者の生存期間を延長し、生存率を高めることが期待される。

本発明の癌転移抑制剤は、既知の化学療法、外科的治療法、放射線療法、温熱療法や免疫療法などと組み合わせて用いることができる。特に、本発明の癌転移抑制剤は、既知の抗腫瘍剤および／または癌転移抑制物質との併用により、さらに癌転移抑制効果を高めることができる。本発明の癌転移抑制剤を併用することにより、投与すべき既知の抗腫瘍剤および／または癌転移抑制物質の量を減量することができ、これにより、これらの薬物により引き起こされる副作用（白血球減少、血小板減少、出血、貧血、食欲不振、悪心、嘔吐、口内炎、下痢、発疹、脱毛、皮膚の色素沈着、発熱、倦怠感、頭痛、肝機能障害、蛋白尿、浮腫、過敏症等）を低減することができる場合がある。

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

本発明の癌転移抑制剤は、1又は2以上の製剤学的に許容される製剤用添加物と有効成分である一般式（I）で示される化合物とを含む医薬組成物の形態で提供することが好ましい。

本発明の癌転移抑制剤は、種々の形態で投与することができ、経口投与でも非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、皮下又は皮内等への注射、直腸内投与、経粘膜投与など）でもよい。経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、散剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤などを挙げることができ、非経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、注射剤、点滴剤、坐剤、経皮吸収剤などを挙げることができるが、本発明の薬剤の剤形はこれらに限定されることはない。さらに、公知の技術によって持続性製剤とすることもできる。

本発明の薬剤の製造に用いられる製剤用添加物の種類は特に限定されず、当業者が適宜選択可能である。例えば、賦形剤、崩壊剤又は崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、基剤、溶解剤又は溶解補助剤、分散剤、懸濁剤、乳化剤、緩衝剤、抗酸化剤、防腐剤、等張化剤、pH調節剤、安定化剤などを用いることができ、これらの目的で使用される個々の具体的成分は当業者に周知されている。

経口投与用の製剤の調製に用いることができる製剤用添加物として、例えば、ブドウ糖、乳糖、D-マンニトール、デンプン、又は結晶セルロース等の賦形剤；カルボキシメチルセルロース、デンプン、又はカルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤又は崩壊補助剤；ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、又はゼラチン等の結合剤；ステアリン酸マグネシウム又はタルク等の滑沢剤；ヒドロキシプロピルメチルセルロース、白糖、ポリエチレングリコール又は酸化チタン等のコーティング剤；ワセリン、流動パラフィン、ポリエチレングリコール、ゼラチン、カオリン、グリセリン、精製水、又はハードファット等の基剤を用いることができる。

注射あるいは点滴用の製剤の調製に用いることができる製剤用添加物としては、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール等の水性あるいは用時溶解型

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

注射剤を構成しうる溶解剤又は溶解補助剤；ブドウ糖、塩化ナトリウム、D-マンニトール、グリセリン等の等張化剤；無機酸、有機酸、無機塩基又は有機塩基等の pH 調節剤等の製剤用添加物を用いることができる。

本発明の薬剤はヒトを含む哺乳動物に投与することができる。

本発明の薬剤の投与量は患者の年齢、性別、体重、症状、及び投与経路などの条件に応じて適宜増減されるべきであるが、一般的には、成人一日あたりの有効成分の量として $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $1,000 \text{ mg}/\text{kg}$ 程度の範囲であり、好ましくは $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $10 \text{ mg}/\text{kg}$ 程度の範囲である。上記投与量の薬剤は一日一回に投与してもよいし、数回（例えば、2～4回程度）に分けて投与してもよい。

本出願の優先権主張の基礎となる出願である特願 2001-150685 号の明細書に開示した内容は全て引用により本明細書に開示したものとする。

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

実施例

実施例 1：cPA 誘導体の合成とそれらによる癌細胞浸潤抑制

(1-1) 種々の cPA 合成誘導体による癌細胞浸潤抑制

(A) 材料及び方法

cPA 誘導体の化学合成

11 種類の cPA 合成誘導体は、Kobayashi, S., 他, Tetrahedron Letters 34, 4047-4050 (1993) に記載された方法に従って合成された。現在、20 種類の cPA 誘導体が合成されている。そのうち、本研究で用いなかった cPA 誘導体の浸潤抑制活性については、既に向井らによって調べられており、その結果、Pal-cPA は約 85%、Ole-cPA は約 60%、PHYLPA、 Δ Pal-cPA、Lau-cPA、Ara-cPA は 50%前後、LPA 誘導性の浸潤を抑制していた (Mukai, M., 他, Int. J. Cancer 81, 918-922 (1999))。今回用いた cPA 誘導体の構造を、図 2 に示した。

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

細胞培養

300g のオスのドンリ्यूラット（日本生物材料）を無菌的に開腹し、それから得た腸間膜を、37℃で15分間、0.25%トリプシン処理し、150 μ m のステンレスメッシュで濾過、遠心して中皮細胞を回収した。2倍量のイーグルMEM アミノ酸ビタミン培地（ニッスイ）を添加したイーグルMEM1（ニッスイ）に、10%FBSを加えたメディウムで、37℃、5%CO₂の条件下で培養した。一週間培養してコンフルエントまで育った単層の中皮細胞を、浸潤アッセイに用いた。

ラット腹水肝癌細胞（AH-130）の高浸潤性クローンである MM1 細胞は、向井らによって確立され（Int. J. Cancer : 81, 918-922 (1999)）、中皮細胞と同様の条件下で培養した。

In vitro 浸潤アッセイ

in vitro 浸潤アッセイは、明渡らにより開発された（Akedo, H., 他, Cancer Res. 46, 2416-2422 (1986)）。コンフルエントになるまで育てた中皮細胞層に、10%FBS、または 25 μ M LPA（SIGMA）存在下で、MM1 細胞を重層培養し、25 μ M cPA を添加した。37℃、5%CO₂の条件下で20時間培養したのち、10%ホルマリンで固定して、位相差顕微鏡下で、浸潤した MM1 細胞のコロニーをカウントした（図3）。

cPA 及び LPA は、0.1% fatty-acid free BSA（SIGMA）を含む PBS 中で氷冷して超音波処理し、エマルジョン化して、-20℃に保存したものを使用した。

(B) 結果及び考察

11 種類の cPA 誘導体による癌細胞浸潤抑制

いくつかの cPA 誘導体のうち、Pal-cPA が FBS 誘導性、LPA 誘導性のいずれの浸潤をも強く抑制することが明らかになっている（Mukai, M., 他, Int. J. Cancer 81, 918-922 (1999)）。cPA の構造と、浸潤抑制の強さの関連を調べるために、Pal-cPA を含む化学合成した 11 種類の cPA 誘導体の癌細胞浸潤への影響を調べた。

10%FBS 存在下で浸潤アッセイを開始して20時間後に細胞を固定し、浸潤したコロニーをカウントしたところ、Pal-cPA 以外に 5 種類の 25 μ M cPA 誘導体につ

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

いて、50%を越える浸潤抑制が見られた(図4)。この5種類について、さらにLPA誘導性の浸潤に対する影響を調べた(図5)。その結果、グリセロール骨格1位に結合する脂肪酸種の違いによる浸潤抑制活性の差が見いだされた。sn-1位にEPAを持つcPA-12によって、FBS誘導の浸潤は約70%抑制されたが、LPA誘導の浸潤は抑制されなかった。このことから、FBS中には、LPA以外の浸潤促進因子が含まれ、cPA-12はその因子に誘導される浸潤を抑制している可能性が考えられる。このことは、10%FBSあるいは25 μ M LPAにより、MM1細胞の浸潤が同程度に誘導されるが、10%FBSを含む培地中のLPA濃度はその1/10程度である事とも一致する。さらには、cPAによる浸潤抑制作用が、その脂肪酸種によって特異性を付与されていることが示され、この構造-活性相関についてはさらに検討する必要がある。また、環状リン酸基の開環を防ぐためにデザインされた、sn-3位のOをCに置き換えたcarba-cPAによって、強い浸潤抑制活性が観察された。

また、MM1細胞のみcPAで前処理し、メディウムで洗ってからLPA存在下で中皮細胞に重層した場合にも、浸潤抑制活性は失われなかったこと、また、中皮細胞のみをcPAで前処理し、洗浄後にLPA存在下でMM1細胞を重層した場合に明らかな浸潤が見られたことから、cPAは中皮細胞ではなく、MM1細胞に影響していることが示された。

(1-2) Carba-cPAによる癌細胞浸潤抑制

(A) 材料及び方法

Carba-cPAの合成

Carba-cPAの合成法は、東京理科大学薬学部、小林進によって開発された。以下の文中の数字は、図6の図中の番号と一致する。

市販の(R)-ペンシルグリシジルエーテル(1)を $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ で活性化させ、メチルホスホン酸ジメチルエステルにn-BuLiを作用させて得られるリチオ体を反応させることでアルコール(2)を得た。得られたアルコールを、トルエン中で過剰のp-トルエンスルホン酸のピリジニウム塩を用いて80℃で反応させることにより、

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

環化体(3)を得た。この環化体を、水素雰囲気下で 20% Pd(OH)₂-C を用いて加水素分解し、脱ベンジル化を行った(4)。縮合剤として 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩を用いて、脂肪酸と反応させてカップリング体(5)を得た。次に、求核剤としてプロモトリメチルシランを用いて、メチル基だけを位置選択的に除去し、環状ホスホン酸(6)を得た。これをエーテルを用いて分液ロートに移しこみ、少量の 0.02N の水酸化ナトリウム水溶液を滴下して、分液操作を行い、ナトリウム塩(7)として抽出、精製した。

低濃度の carba-cPA を用いた in vitro 浸潤アッセイ

MM1 細胞に 0.5 μ M、1 μ M、10 μ M の carba-cPA を添加し、25 μ M LPA 存在下で 1-1 と同様に in vitro 浸潤アッセイを行った。

MM1 細胞の増殖に対する carba-cPA の影響

10%FBS を含むメディウムに、12.5 μ M、25 μ M の cPA を添加し、37°C、5%CO₂ の条件下で 24 時間、72 時間培養した MM1 細胞の細胞数を、血球計算盤を用いてカウントした。

(B) 結果及び考察

低濃度の carba-cPA による癌細胞浸潤抑制

脂肪酸種による抑制活性の差を見るために、低濃度の carba-cPA を添加して浸潤アッセイを行った(図 7)。

天然体 cPA では、sn-1 位にパルミチン酸の結合したものが最も強く浸潤を抑制したが、carba-cPA では、パルミチン酸が結合した cPA-18 よりも、オレイン酸の結合した cPA-19、パルミトオレイン酸の結合した cPA-20 の方が、強い浸潤抑制活性を示した。

MM1 細胞の増殖に対する carba-cPA の影響

図 8 に示したように、sn-1 位にパルミチン酸の結合した cPA は、天然体(cPA-5)も carba 体(cPA-18)も MM1 細胞の増殖には影響しなかった。一方、より強い浸潤抑制活性を示した carba-Ole-cPA (cPA-19)、carba- Δ Pal-cPA (cPA-20) は、増殖抑制作用をも示した。天然体でも Ole-cPA、 Δ Pal-cPA がいずれも増殖抑制作

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

用をもつ事が示されているが、これらの分子種の浸潤抑制作用は弱いことが、向井らにより報告されている (Mukai, M., 他, Int. J. Cancer 81, 918-922 (1999))。従って、脂肪酸の種類による細胞増殖への影響と、浸潤抑制作用とは、おそらく独立した現象であると考えられる。

実施例 2 : 血清・LPA に依存しない癌細胞の浸潤に対する cPA の効果

(A) 材料及び方法

細胞培養

ヒト繊維肉腫細胞である HT-1080 細胞は、向井らにより確立され (Int. J. Cancer: 81, 918-922 (1999))、1/100 量の非必須アミノ酸溶液 (GIBCO BRL) を添加したイーグル MEM1 (ニッスイ) に、10%FBS を加えたメディウムで、37℃、5%CO₂ の条件下で培養した。

In vitro 浸潤アッセイ

HT-1080 細胞を、0.05%トリプシン処理によって回収し、無血清培地で洗浄後、血清・LPA 非存在下で第 1 章に示したのと同様なアッセイを行い、4 時間後に細胞を固定し、浸潤した細胞をカウントした。

HT-1080 細胞の培養上清を用いた MM1 細胞の in vitro 浸潤アッセイ

HT-1080 細胞のメディウムを無血清培地に換えて、37℃、5%CO₂ の条件下で 20 時間培養した。このメディウムを回収し、遠心した上清を、培養上清として用いた。この上清を用いて、一度洗った MM1 細胞を懸濁し、段落 0043 と同様に浸潤アッセイを行った。

(B) 結果及び考察

血清・LPA 非依存的な癌細胞浸潤に対する carba-cPA の影響

HT-1080 細胞は、in vitro 浸潤アッセイ系において、血清・LPA 非依存的に浸潤する。この現象もまた、Pal-cPA によって抑制されることが見いだされている (Mukai, M., 他, Int. J. Cancer 81, 918-922 (1999))。この知見に基づいて、同じ脂肪酸を持つ cPA-18(carba- Pal-cPA)を用いて、この細胞の浸潤に対する

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

carba-cPA の影響を調べた。図 9 に示したように、carba-cPA はこの細胞においても、天然体と同程度か、またはそれ以上の強さの浸潤抑制活性を示した。

HT-1080 細胞の培養上清が MM1 細胞の浸潤に与える影響

HT-1080 細胞が自ら LPA を合成し、その LPA によって浸潤が誘導される可能性を考え、LPA 依存的に浸潤する MM1 細胞を HT-1080 細胞の培養上清で懸濁し、中皮細胞に重層して、浸潤が起こるか否かを検討した。HT-1080 細胞の無血清培養上清で、 1.5×10^5 cells/ml の MM1 細胞を懸濁し、in vitro 浸潤アッセイを行った結果を表 1 に示す。

その結果、MM1 細胞の浸潤は促進されず（表 1）、また、HT-1080 細胞を用いた in vitro 浸潤アッセイ系に、 $25 \mu\text{M}$ の LPA を添加してみても、浸潤がより促進されることはなかった。これらのことから、HT-1080 細胞の浸潤促進因子は LPA とは別のものであることが示唆された。

表 1

添加した培地	浸潤細胞の数 / cm^2
未処理培地	97.7 ± 38.4
コンディション培地	72.2 ± 18.4

実施例 3 : cPA による浸潤抑制のシグナル伝達系の解析

(A) 材料及び方法

細胞内 cAMP 濃度を上昇させる試薬の、浸潤に対する影響

cAMP 合成酵素であるアデニル酸シクラーゼを直接活性化する Forskolin(Wako)、アデニル酸シクラーゼを活性化する G タンパク質 (G_s) の不活性化を妨げるコレラ毒素 (CTX, Cholera Toxin) (GIBCO BRL)、膜透過性で、細胞内に入って cAMP と同様の働きをする Bt_2cAMP (nacalai tesque)、cAMP 分解酵素であるホスホジエステラーゼを阻害するイソブチルメチルキサンチン (IBMX、3-isobutyl-1-methylxanthine) (SIGMA) を、in vitro 浸潤アッセイ系に添加し、

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

25 μ M LPA 存在下で MM1 細胞の浸潤に対する影響を調べた。

細胞内 cAMP の測定

無血清培地中の MM1 細胞を 1mM の IBMX で 10 分間前処理した後、25 μ M の LPA または cPA、ポジティブコントロールとして、浸潤を抑制することが確認された 10 μ M の Forskolin を添加し、一定時間後、10%氷冷 TCA を加えて反応を止めた。遠心した上清を、water-saturated diethylether で 4 回洗って TCA を除き、60°C の窒素ガス流下で溶媒を全てとばし、得られたサンプル中の cAMP を、Cyclic AMP [3 H] assay system (Amersham) を用いて測定した。

(B) 結果と考察

細胞内 cAMP 濃度の上昇が、癌細胞の浸潤に与える影響

細胞内 cAMP 濃度の上昇が、cAMP-dependent protein kinase A の活性化を介して低分子量 G タンパク質の一つである Rho の活性を阻害することが知られている (Laudanna, C., 他, J. Biol. Chem. 272, 24141-24144 (1997); 及び Dong, J-M., 他, J. Biol. Chem. 273, 22554-22562 (1998))。また、Pal-cPA が、MM1 細胞の細胞内 cAMP 濃度の上昇を導くことが報告されている (Mukai, M., 他, Int. J. Cancer 81, 918-922 (1999))。このことから、Rho を介することが明らかになっている LPA 誘導性の浸潤に対する cAMP の影響を調べた。

図 10 に示したように、どの試薬によっても、癌細胞の浸潤は抑制された。このことから、このうちの一つ、Forskolin をポジティブコントロールとして用い、carba-cPA 添加による細胞内 cAMP 濃度の変化を測定し、その浸潤抑制活性への関与を検討した。

Carba-cPA の、細胞内 cAMP 濃度に対する影響

図 11 に示したように、Forskolin による cAMP 濃度の上昇が測定できているにも関わらず、以前に報告されているような、Pal-cPA の添加による cAMP 濃度の早い上昇を確認することができなかった。また、carba-Pal-cPA の添加によっても結果は同様だった。しかし、同じ細胞で、LPA によって浸潤は誘導され、Pal-cPA によってその浸潤は抑制されることから、cAMP を介さない、別の浸潤抑制機構の

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

存在が示唆された。

(実施例 1 ～ 3 のまとめ)

実施例 1 では、種々の cPA 誘導体を用いて *in vitro* 浸潤アッセイを行った。最初に、血清誘導性の浸潤に対する cPA の影響を調べたところ、図 4 に示したように、構造の違いによる浸潤抑制活性の差が見られた。このうち、25 μ M 添加することによって 50% を越える浸潤抑制を示す、Pal-cPA を含む 6 種類の cPA 誘導体について、LPA 誘導性の浸潤に対する影響を調べた (図 5)。血清誘導性の浸潤を約 70% 抑制した、sn-1 位に EPA を有する cPA-12 は、LPA 誘導性の浸潤を抑制しなかった。このことから、血清中に LPA 以外の浸潤促進物質が存在する可能性が示唆された。さらに、環状リン酸基の開環を防ぐためにデザインされた、sn-3 位の O を C に置き換えた carba-cPA による、浸潤抑制活性が見いだされた。この活性は非常に強く、天然体の 10～100 倍ほどであった (図 7)。

実施例 2 では、この carba-cPA に注目し、浸潤に血清・LPA を必要としない癌細胞を用いて、その浸潤に対する carba-cPA の効果を調べた。図 9 に示したように、LPA 非依存性の浸潤においても、carba-cPA による、天然体 cPA と同様な強い浸潤抑制活性がみられた。

さらに実施例 3 では、carba-cPA による浸潤抑制の作用機作の解析を行った。LPA が低分子量タンパク質の一つである Rho の活性化を介して浸潤を促進すること、また、Pal-cPA の添加によって細胞内 cAMP 濃度が上昇し、さらに Rho の活性が抑制されることから、carba-cPA によっても細胞内 cAMP 濃度が上昇し、その結果として浸潤が抑制される可能性を考え、細胞内 cAMP 濃度の測定を行った (図 11)。しかし、ポジティブコントロールである Forskolin による cAMP 濃度の上昇が測定されているにもかかわらず、Pal-cPA による cAMP 濃度の上昇を確認することができなかった。さらに、carba-Pal-cPA によっても cAMP 濃度の変化は見られなかった。Pal-cPA について、再現性がみられないことについては、MM1 細胞が変化してしまった可能性が考えられる。しかし、この細胞においても血清・LPA

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

による浸潤誘導、さらに Pal-cPA による浸潤抑制は見られることから、cAMP を介さない、別の浸潤抑制の系の存在が示唆された。

実施例 4 : B16 melanoma 血行性肺転移モデルを用いた B16 melanoma の肺転移に対する環状ホスファチジン酸誘導体 cPA-19 及び cPA-20 の抑制作用

(試験材料及び方法)

1. 被験物質、媒体及び陽性対照物質

被験物質として cPA-19 及び cPA-20 を使用した。媒体として、Albumin, Bovine[essentially Fatty Acid Free](BSA, Lot No. 89H7604, Sigma chemical company)を Ca^{2+} 及び Mg^{2+} を含まない PBS (pH 7.2) により溶解して調製した 0.1w/v% BSA/PBS を使用した。調製後、フィルター (0.22 μm , Millipore) により濾過滅菌した。用時調製した。陽性対照物質として cPA-5 を使用した。

2. 混合物調製法及び頻度

被験物質又は陽性対照物質に対して必要量の媒体を加え、超音波処理により溶解し、0.16 mg/mL 溶液を調製した。さらに被験物質では 0.16 mg/mL 溶液を媒体により希釈し、0.08 及び 0.02 mg/mL 溶液を調製した。混合物質はいずれも用時調製した。

3. 試験系及び試験系の環境条件

日本チャールス・リバー株式会社よりマウスを購入した。系統は C57BL/6NCrj、性別は雌、入荷動物数は 60 匹、入荷時週齢は 4 週齢、体重範囲は 10.2~14.0g であった。試験系の環境条件は以下の通りである

温度 : 23~26°C、湿度 : 54~60°C、換気回数 : 13 回/時、照明 : 12 時間 (午前 7 時~午後 7 時)、飼料 : 固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社) を高圧蒸気滅菌して自由に摂取させた。飲水 : 次亜塩素酸ナトリウムを添加した井戸水 (残留塩素濃度約 2 ppm) を給水瓶で自由に摂取させた。床敷 : ホワイトフレーク (日本

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

チャールス・リバー株式会社)を高圧蒸気滅菌して使用した。飼育ケージ及び交換頻度：高圧蒸気滅菌したポリカーボネイト製ケージ(W215×H140×D320 mm)を使用し、床敷と同時に1週間に2回交換した。ケージ収容動物数：検疫馴化期間においては1ケージ当たり5匹、試験期間においては1ケージ当たり3匹収容した。洗浄及び消毒：飼育室の清掃を毎日行い、床を消毒液で清拭した。

4. 試験方法

4. 1 腫瘍細胞の名称

腫瘍細胞としてマウス悪性黒色腫 B16-F0 を使用した。大日本製薬株式会社より購入した。

4. 2 培養

培養は10% Fetal bovine serum 及びカナマイシン含有のダルベッコ変法イーグル培地を使用した。37℃、5%CO₂に設定したCO₂インキュベーター内で、95%湿度条件下で静置培養した。腫瘍細胞がセミコンフルエントの状態に達した後、0.25%トリプシン-0.02%EDTA 混合液により細胞をハーベストした。培地を加えトリプシンの作用を停止させるとともにピペッティングを行い、細胞浮遊液を調製した。培養用培地により1/10に希釈して、移植に十分な量となるまで継代した。

4. 3 移植用腫瘍細胞浮遊液の調製

継代法と同じ手法により、細胞浮遊液を調製した。即ち、Ca²⁺及びMg²⁺を含まないリン酸緩衝液[PBS(-)]により細胞を洗浄した後、回収した細胞を10mL PBS(-)に懸濁し、細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液の細胞数を計測し、全細胞数とした。50μLの細胞懸濁液、100μLの0.4%トリパンブルー液及び100μLのPBS(-)を混合し、生細胞数を計測した。生細胞数及び全細胞数より細胞の生存率を算出した。これらの結果をもとに、生細胞数を1×10⁷cells/mLに調整し、移植用の腫瘍細胞浮遊液を調製した。

4. 4 投与

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

被験物質投与日の体重を基に、層別連続無作為化法により下記の表 2 に示す 8 試験群に群分けした。

表 2

試験群	投与量 (mg/body)	投与物質濃度 (mg/0.05mL)	腫瘍細胞 浮遊液 (細胞/0.05mL)	投与容量 (mL/body)	投与経路	使用 動物数
媒体	—	—	5×10^5	0.1	i. v.	6
cPA-19	0.001	0.001				6
	0.004	0.004				6
	0.008	0.008				6
	0.001	0.001				6
cPA-20	0.004	0.004				6
	0.008	0.008				6
	0.008	0.008				6

以前の試験の結果より、被験物質及び陽性対照物質は B16 マウス悪性黒色腫の増殖抑制作用を示さないことが判明している。よって媒体、被験物質又は陽性対照物質を B16-F0 細胞浮遊液と 1 : 1 の割合で混合し、この混合液を尾静脈内に投与した。移植細胞数は 5×10^5 cells/body であった。被験物質の用量は 0.001, 0.004 もしくは 0.008 mg/body であり、陽性対照物質の用量は 0.008 mg/body であった。

4. 5 一般状態の観察及び体重測定

被験物質投与後 14 日までの観察期間とした。この間に毎日生死の確認を行い、一般状態を観察した。週 2 回体重測定を行った。

4. 6 剖検

被験物質投与後 14 日に、イソフルラン麻酔下にて腹大静脈後部より採血を行った。放血致死後、胸腔内及び腹腔内の転移結節の有無を確認した。肺を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて固定後、肺転移結節数を实体顕微鏡下(倍率: 10 倍)にて計測した。

4. 7 病理組織学的検査

肺転移結節数を計測後、標本をパラフィン包埋し、薄切切片を作製した。これ

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

らの切片よりヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製したのち、左葉及び後葉の一定部位において、転移巣の数を計測し、大きさにより分類した。大きさは転移巣の長径において40倍の対物レンズ径(0.65 mm)を基準として0.65 mm未満のものを小型とし、0.65 mm以上1.30 mm未満のものを大型として分類した。また、転移巣に対するリンパ球の浸潤の程度を定性的に確認した。

5. 統計学的解析処理方法

各試験群の代表値は、平均値±標準偏差(mean±S.D.)で表示した。平均値の差の検定は、転移結節数については媒体群とcPA-19群との間、及び媒体群とcPA-20群との間でDunnett's multiple comparison test (Dunnettの多重比較検定)により行い、媒体群とcPA-5群との間でStudentのT-検定により検定を行った。転移巣数については媒体群を対照として、Wilcoxon testにより検定を行った。転移結節又は転移巣を有する個体数については媒体群を対照としてFisher's exact probability test (Fisherの抽出可能性検定)により検定を行った。有意水準は1及び5%とした。

(結果)

1. 一般状態

全試験群において、観察期間中の死亡例はみられなかった。また、一般状態に異常は認められなかった。

2. 体重の推移(図12、表3)

各試験群における体重の推移を図12および表3に示す。

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

表3: BI6-F0 メラノーマ担持マウスの体重に対する cPA-19 又は cPA-20 の影響

群	投与量 (mg/body)	N	体重 (g)				
			0日目	4日目	7日目	11日目	14日目
溶媒	—	6	16.0±0.5	15.7±0.8	16.1±1.1	16.9±1.2	17.3±1.2
cPA-19	0.001	6	15.9±0.6	15.5±0.5	15.8±0.7	16.5±1.0	17.1±1.2
	0.004	6	15.9±0.6	16.0±0.5	16.1±0.6	16.7±0.6	17.6±0.9
	0.008	6	15.9±0.6	15.4±0.5	15.9±0.5	16.8±0.5	17.0±0.4
cPA-20	0.001	6	15.9±0.6	15.5±0.3	16.1±0.6	16.8±0.4	17.4±0.6
	0.004	6	16.0±0.6	16.0±0.7	16.2±0.6	16.9±0.7	17.5±0.8
	0.008	6	15.9±0.5	16.1±0.8	16.3±0.8	17.0±0.9	17.7±0.8
CPA-5	0.008	6	15.9±0.6	15.8±0.9	16.2±1.0	17.0±0.8	17.4±1.0

各値は平均±S.D.を示す。
溶媒群からの有意差はない。

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

被験物質投与日において、媒体群では 16.0 ± 0.5 g であった。cPA-19 の 0.001, 0.004 及び 0.008 mg/body 投与群では、それぞれ 15.9 ± 0.6 , 15.9 ± 0.6 及び 15.9 ± 0.6 g であった。cPA-20 の 0.001, 0.004 及び 0.008 mg/body 投与群では、それぞれ 15.9 ± 0.6 , 16.0 ± 0.6 及び 15.9 ± 0.5 g であった。cPA-5 群では 15.9 ± 0.6 g であった。被験物質投与後 4 日において、媒体群では 15.7 ± 0.8 g であった。cPA-19 の 0.001, 0.004 及び 0.008 mg/body 投与群では、それぞれ 15.5 ± 0.5 , 16.0 ± 0.5 及び 15.4 ± 0.5 g であった。cPA-20 の 0.001, 0.004 及び 0.008 mg/body 投与群では、それぞれ 15.5 ± 0.3 , 16.0 ± 0.7 及び 16.1 ± 0.8 g であった。cPA-5 群では 15.8 ± 0.9 g であった。被験物質投与後 7 日において、媒体群では 16.1 ± 1.1 g であった。cPA-19 の 0.001, 0.004 及び 0.008 mg/body 投与群では、それぞれ 15.8 ± 0.7 , 16.1 ± 0.6 及び 15.9 ± 0.5 g であった。cPA-20 の 0.001, 0.004 及び 0.008 mg/body 投与群では、それぞれ 16.1 ± 0.6 , 16.2 ± 0.6 及び 16.3 ± 0.8 g であった。cPA-5 群では 16.2 ± 1.0 g であった。被験物質投与後 11 日において、媒体群では 16.9 ± 1.2 g であった。cPA-19 の 0.001, 0.004 及び 0.008 mg/body 投与群では、それぞれ 16.5 ± 1.0 , 16.7 ± 0.6 及び 16.8 ± 0.5 g であった。cPA-20 の 0.001, 0.004 及び 0.008 mg/body 投与群では、それぞれ 16.8 ± 0.4 , 16.9 ± 0.7 及び 17.0 ± 0.9 g であった。cPA-5 群では 17.0 ± 0.8 g であった。被験物質投与後 14 日において、媒体群では 17.3 ± 1.2 g であった。cPA-19 の 0.001, 0.004 及び 0.008 mg/body 投与群では、それぞれ 17.1 ± 1.2 , 17.6 ± 0.9 及び 17.0 ± 0.4 g であった。cPA-20 の 0.001, 0.004 及び 0.008 mg/body 投与群では、それぞれ 17.4 ± 0.6 , 17.5 ± 0.8 及び 17.7 ± 0.8 g であった。cPA-5 群では 17.4 ± 1.0 g であった。各測定時点において、体重値を媒体群と比較したところ、cPA-19, cPA-20 及び cPA-5 群では有意差は認められなかった。また、各測定時点の体重値を被験物質投与日の体重値と比較したところ、被験物質投与後 4 日において媒体群、cPA-19 の 0.001 及び 0.008 mg/body 投与群、cPA-20 の 0.001 mg/body 投与群及び cPA-5 では一過性の体重減少が認められた。

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

3. 肺転移結節(図 1 3、表 4)

被験物質投与後 14 日に摘出した、肺における転移結節数の結果を図 1 3 および表 4 に示す。

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

表4：マウスにおけるB16-F0メラノーマの肺転移に対するcPA-19又はcPA-20の影響

群	投与量 (mg/body)	N	肺腫瘍節を有する マウスの数	肺腫瘍節の数 (平均±S.D.)	範囲 (最小-最大)
溶媒	—	6	6	49±20	28-84
cPA-19	0.001	6	6	54±12	37-66
	0.004	6	6	4±2**	2-6
	0.008	6	0 ^{##}	0±0**	0
cPA-20	0.001	6	6	58±40	17-112
	0.004	6	2 ^{##}	1±2 ^{##}	0-4
	0.008	6	1 ^{##}	0±0 ^{##}	0-1
CPA-5	0.008	6	6	21±13 ^{\$}	5-38

&P<0.05, &&P<0.01 対溶媒群 (Fisherの抽出可能性検定)

**P<0.01 対溶媒群 (Dunnettの多重比較検定)

###P<0.01 対溶媒群 (Dunnettの多重比較検定)

\$P<0.05 対溶媒群 (StudentのT検定).

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

転移結節を有する個体数は媒体群では6例であった。cPA-19の0.001, 0.004及び0.008 mg/body投与群ではそれぞれ6, 6及び0例であった。cPA-20の0.001, 0.004及び0.008 mg/body投与群ではそれぞれ6, 2及び1例であった。cPA-5群では6例であった。転移結節を有する個体数は、媒体群と比較してcPA-19の0.008 mg/body投与群、cPA-20の0.004及び0.008 mg/body投与群では有意に減少した。

転移結節数は、媒体群では 49 ± 20 (最少—最大: 28-84、以下同じ)個であった。cPA-19群の0.001, 0.004及び0.008 mg/body投与群ではそれぞれ 54 ± 12 (37-66), 4 ± 2 (2-6)及び 0 ± 0 (0)個であった。cPA-20群の0.001, 0.004及び0.008 mg/body投与群ではそれぞれ 58 ± 40 (17-112), 1 ± 2 (0-4)及び 0 ± 0 (0-1)個であった。cPA-5群では 21 ± 13 (5-38)個であった。肺転移結節数は、媒体群と比較してcPA-19の0.004及び0.008 mg/body投与群 cPA-20の0.004及び0.008 mg/body投与群では有意に減少し、またcPA-5群においても有意に減少した。

4. 剖検(表5)

剖検の結果を表5に示す。

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

表 5 : 胸腔内及び腹腔内の転移結節に対する cPA-19 又は cPA-20 の影響

群	投与量 (mg/body)	動物 番号	胸腔	腹腔						陰核腺傍
				横隔膜	脾臓	副腎	腎臓	卵巣	脂肪 組織	
溶媒	—	301	—	—	+	—	—	+	+	—
		302	—	—	+	—	—	—	—	—
		303	—	—	—	—	—	+	—	—
		304	—	—	+	—	—	—	—	—
		305	—	—	+	—	—	—	+	—
		306	+	—	+	—	—	—	—	—
cPA-19	0.001	307	—	—	—	+	+	+	+	—
		308	—	—	—	—	+	+	—	—
		309	+	—	+	—	—	—	—	—
		310	—	—	—	—	—	—	—	—
		311	—	—	—	—	—	—	—	—
		312	—	—	—	—	—	—	—	—
	0.004	313	—	—	+	—	—	—	—	—
		314	—	—	—	—	—	—	—	—
		315	—	—	—	—	—	—	—	—
		316	—	—	—	—	—	—	—	—
		317	—	—	—	—	—	—	—	—
		318	—	—	—	+	—	—	+	—
	0.008	319	—	—	—	—	—	—	—	—
		320	—	—	—	—	—	—	—	—
		321	—	—	—	—	—	—	—	—
		322	—	—	—	—	—	—	—	—
		323	—	—	+	—	—	—	—	—
		324	—	—	—	—	—	—	—	—
cPA-20	0.001	325	—	—	—	—	—	—	—	—
		326	—	—	+	—	—	—	—	—
		327	+	+	—	—	—	—	—	+
		328	—	—	—	—	—	+	—	—
		329	—	—	—	—	—	—	—	—
		330	—	—	—	—	—	—	—	—
	0.004	331	—	—	—	—	—	—	—	—
		332	—	—	—	—	—	—	—	—
		333	—	—	—	—	—	—	—	—
		334	—	—	—	—	—	—	—	—
		335	—	—	—	—	—	—	—	—
		336	—	—	+	—	—	—	—	—
cPA-5	0.008	337	—	—	—	—	—	—	—	—
		338	—	—	—	—	—	—	—	—
		339	—	—	—	—	—	—	—	—
		340	—	—	—	—	—	—	—	—
		341	—	—	—	—	—	—	—	—
		342	—	—	+	—	—	—	—	—
	0.008	343	—	—	+	—	—	—	—	—
		344	—	—	+	—	—	—	—	—
		345	—	—	+	—	—	—	—	—
		346	—	—	—	—	—	—	—	—
		347	—	—	—	—	—	—	—	—
		348	—	—	—	—	—	—	—	—

— : なし

+ : あり

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

媒体群において胸腔内(1例)、腹腔内では脾臓(5例)、卵巣(2例)及び脂肪組織(2例)にて転移結節が認められた。cPA-19の0.001 mg/body投与群において胸腔内(1例)、腹腔内では脾臓(1例)、卵巣(2例)、副腎(1例)、腎臓(2例)及び脂肪組織(1例)において転移結節が認められた。cPA-19の0.004 mg/body投与群において胸腔内では転移結節は認められず、腹腔内では脾臓(1例)、副腎(1例)及び脂肪組織(1例)において転移結節が認められた。cPA-19の0.008 mg/body投与群において胸腔内では転移結節は認められず、腹腔内では脾臓(1例)において転移結節が認められた。cPA-20の0.001 mg/body投与群において、胸腔内(1例)、腹腔内では横隔膜(1例)、脾臓(1例)、卵巣(1例)、及び陰核腺傍(1例)において転移結節が認められた。cPA-20の0.004 mg/body投与群において胸腔内では転移結節は認められず、腹腔内では脾臓(1例)において転移結節が認められた。cPA-20の0.008 mg/body投与群において胸腔内では転移結節は認められず、腹腔内では脾臓(1例)において転移結節が認められた。cPA-5群において胸腔内では転移結節は認められず、腹腔内では脾臓(3例)において転移結節が認められた。cPA-19群及びcPA-20群において、用量の増加に伴い、胸腔内や腹腔内に転移結節を有する個体数が減少した。

5. 病理組織学的検査(図14、表6および表7)

病理組織学的検査の結果を図14、表6および表7に示す。

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

表6：マウスのB16-F0 ミエローマの肺転移巣の数に対するcPA-19又はcPA-20の影響

群	投与量 (mg/body)	N	転移巣を有する マウスの数	小さいサイズ ²⁾	1切片当たりの転移巣の数 ¹⁾ 大きいサイズ ²⁾	総数
溶媒	—	6	6	1.3±1.5	1.3±1.0	2.7±2.4
cPA-19	0.001	6	6	3.0±1.3	0.7±0.8	3.7±1.8
	0.004	6	2 ^a	0.3±0.5	0±0 ^{!!}	0.3±0.5 [!]
	0.008	6	0 ^{aa}	0±0 [!]	0±0 ^{!!}	0±0 ^{!!}
cPA-20	0.001	6	4	3.2±3.5	1.2±1.3	4.3±4.6
	0.004	6	1 ^{aa}	0.2±0.4	0±0 ^{!!}	0.2±0.4 ^{!!}
	0.008	6	0 ^{aa}	0±0 [!]	0±0 ^{!!}	0±0 ^{!!}
CPA-5	0.008	6	5	1.2±0.8	0.8±0.8	2.0±1.3

1) 左葉および後葉の切片、各値は平均±S.D.を示す。

2) 大きさ：転移巣の長い方の長さ、小さいサイズ：<0.65mm, 大きいサイズ：0.65mm≤かつ<1.3mm

& P<0.05, && P<0.01 対溶媒群 (Fisherの抽出可能性検定).

! P<0.05, !! P<0.01 対溶媒群 (Wilcoxon 検定).

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

表 7 : B16-F0 メラノーマ担持マウスの肺の病理組織学的所見

群	投与量 (mg/body)	動物番号	所見
			メラノーマ転移巣に対する リンパ球の浸潤
溶媒	—	301	—
		302	—
		303	—
		304	+
		305	—
		306	—
cPA-19	0.001	307	—
		308	+
		309	—
		310	—
		311	—
		312	—
	0.004	313	*
		314	*
		315	—
		316	—
		317	*
		318	*
	0.008	319	*
		320	*
		321	*
		322	*
		323	*
		324	*
cPA-20	0.001	325	—
		326	—
		327	*
		328	++
		329	—
		330	*
	0.004	331	—
		332	*
		333	*
		334	*
		335	*
		336	*
	0.008	337	*
		338	*
		339	*
		340	*
		341	*
		342	*
cPA-5	0.008	343	—
		344	++
		345	—
		346	+
		347	*
		348	—

等級；—, なし；+, 少量；++, 中程度；+++, 多量；*: 未試験（転移巣なし）層

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

転移巣を有する個体数は媒体群では6例であった。cPA-19の0.001, 0.004及び0.008 mg/body 投与群ではそれぞれ6, 2及び0例であった。cPA-20の0.001, 0.004及び0.008 mg/body 投与群ではそれぞれ4, 1及び0例であった。cPA-5群では5例であった。転移巣を有する個体数は、媒体群と比較してcPA-19の0.004及び0.008 mg/body 投与群、cPA-20の0.004及び0.008 mg/body 投与群では有意に減少した。

肺の転移巣数は、媒体群において小型の転移巣が 1.3 ± 1.5 個、大型の転移巣が 1.3 ± 1.0 個でありその合計は 2.7 ± 2.4 個であった。cPA-19の0.001 mg/body 投与群において小型の転移巣が 3.0 ± 1.3 個、大型の転移巣が 0.7 ± 0.8 個でありその合計は 3.7 ± 1.8 個であった。cPA-19の0.004 mg/body 投与群において小型の転移巣が 0.3 ± 0.5 個であり大型の転移巣は認められなかった。cPA-19の0.008 mg/body 投与群においては転移巣は認められなかった。cPA-20の0.001 mg/body 投与群において小型の転移巣が 3.2 ± 3.5 個、大型の転移巣が 1.2 ± 1.3 個でありその合計は 4.3 ± 4.6 個であった。cPA-20の0.004 mg/body 投与群において小型の転移巣が 0.2 ± 0.4 個であり大型の転移巣は認められなかった。cPA-20の0.008 mg/body 投与群においては転移巣は認められなかった。cPA-5群において小型の転移巣が 1.2 ± 0.8 個、大型の転移巣が 0.8 ± 0.8 個でありその合計は 2.0 ± 1.3 個であった。媒体群と比較して、小型の転移巣はcPA-19の0.008 mg/body 投与群及びcPA-20の0.008 mg/body 投与群において、大型の転移巣ではcPA-19の0.004及び0.008 mg/body 投与群、cPA-20の0.004及び0.008 mg/body 投与群において、またそれらの合計ではcPA-19の0.004及び0.008 mg/body 投与群、cPA-20の0.004及び0.008 mg/body 投与群において、それぞれ有意に減少した。

転移巣に対するリンパ球の浸潤は媒体群では6例中1例に認められた。cPA-19の0.001 mg/body 投与群では6例中1例に転移巣に対するリンパ球の浸潤が認められ、0.004 mg/body 投与群の2例では認められなかった。cPA-20の0.001 mg/body 投与群では4例中1例に転移巣に対するリンパ球の浸潤が認められ、0.004 mg/body 投与群の1例では認められなかった。cPA-5群では5例中2例に転移巣に対

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

するリンパ球の浸潤が認められた。各試験群において、転移巣に対するリンパ球の浸潤の程度に差は認められなかった。

(考察)

癌転移の主要経路の1つである血行性転移は、癌細胞の原発巣からの離脱と周辺組織への浸潤から始まり、リンパ管や血管へ侵入し、色々な器官の毛細血管床での接着を経て、遠隔部位での増殖による転移巣の形成に至るまで複雑な反応カスケードから成り立っている。本実験で用いた B16 melanoma 血行性肺転移モデルは、原発巣を遊離した癌細胞が脈管内に侵入した以降の過程を調べることが可能なモデルである (Poste G. and Fidler I. J.: The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 283:139-146 (1980); 及び、がん転移研究会編[責任編集]入村達郎: がんの浸潤・転移研究マニュアル, 株式会社金芳堂, p. 7-11, 京都(1994))。リゾホスファチジン酸(LPA)はリゾリン脂質メディエーターの1つであり(小林哲幸, 室伏きみ子: リゾリン脂質メディエーターとしてのリゾホスファチジン酸と環状ホスファチジン酸の存在, 代謝及び生理機能, 蛋白質 核酸 酵素 44: 1118-1126(1999)), *in vitro* 浸潤実験系において浸潤を強く誘導することが知られている(向井睦子, 明渡均: リゾホスファチジン酸によるがん細胞浸潤の誘導と環状ホスファチジン酸による浸潤の抑制, 蛋白質 核酸 酵素 44: 1126-1131(1999); Mukai M., Imamura F., Ayaki M., Shinkai K., Iwasaki T., Murakami-Murofushi K., Murofushi H., Kobayashi S., Yamamoto T., Nakamura H. and Akedo H.: Inhibition of tumor invasion and metastasis by a novel lysophosphatidic acid (cyclic LPA). *Int. J. Cancer* 81:918-922 (1999))。このLPAの構造類似体である環状ホスファチジン酸(cPA)は、*in vitro* 浸潤実験系においてLPAとは反対に浸潤を強く抑制することが知られている(小林哲幸, 室伏きみ子: リゾリン脂質メディエーターとしてのリゾホスファチジン酸と環状ホスファチジン酸の存在, 代謝及び生理機能, 蛋白質 核酸 酵素 44:1118-1126(1999))。そこで今回、B16 melanoma 血行性肺転移モデルを用いて、cPA誘導体である cPA-19

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

及び cPA-20 のマウス悪性黒色腫 B16-F0 の肺転移に対する抑制作用を検討した。

体重の経時的推移において、cPA-19 の 0.001 及び 0.008 mg/body 投与群、cPA-20 の 0.001 mg/body 投与群では一過性の体重減少が認められた。これは媒体群や cPA-5 群においても認められており、cPA-19 の 0.004 mg/body 投与群及び cPA-20 の 0.004 及び 0.008 mg/body 投与群では認められないことから、被験物質の作用によるものではないと考えられる。またその後順調な体重増加が認められたことから、cPA-19 及び cPA-20 は体重の変化に対して影響を与えないと考えられる。また、肺における B16-F0 の転移結節数において、媒体群では十分な結節数が認められたことから、今回の試験系に問題はなかったと考えられる。cPA-19 及び cPA-20 の両試験群において 0.004 mg/body 投与群は転移結節数を有意に減少させ、0.008 mg/body 投与群ではほぼ完全に転移を抑制した。また肺組織内部の転移巣や肺以外の転移においても同様の結果が得られた。これは cPA-19 及び cPA-20 が B16-F0 の転移を抑制したためと考えられる。一方、cPA-5 群では有意な転移結節数の減少は認められたが、転移巣数を減少させる作用は認められなかった。

以上のことから、本実験モデルにおいて cPA-19 及び cPA-20 は 0.004 及び 0.008 mg/body の用量において B16-F0 の肺転移を抑制する作用を示し、その作用は cPA-5 より強いことが明らかとなった。

産業上の利用の可能性

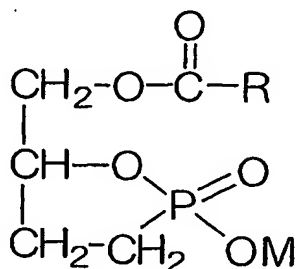
癌の転移は、腫瘍の悪性化を示す最も顕著な現象であり、複雑な過程を経て成立する。なかでも癌細胞の浸潤は特徴的な段階である。本発明により carba-cPA が強い浸潤抑制活性を有することが判明し、新規な癌転移抑制剤を提供することが可能になった。本発明の癌転移抑制剤の利用は、癌治療へ大きく貢献するものである。

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

請求の範囲

1. 一般式 (I) :



(式中、Rは、炭素数 1～30 の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数 2～30 の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数 2～30 の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。Mは、水素原子又は対カチオンである。)

で示される化合物を有効成分として含む、癌転移抑制剤。

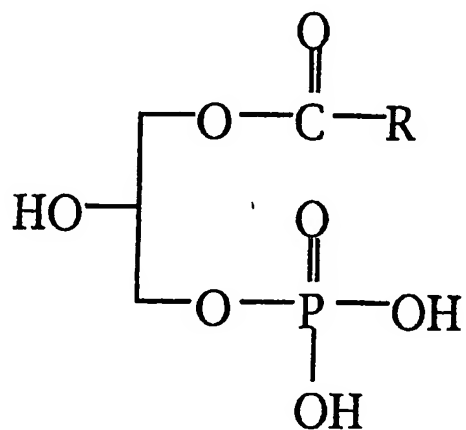
2. 一般式 (I) においてRが、 $-\text{C}_{15}\text{H}_{31}$ 、 $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CHC}_6\text{H}_{13}$ 、又は $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CHC}_8\text{H}_{17}$ であることを特徴とする、請求項1に記載の癌転移抑制剤。

3. 癌細胞の浸潤を抑制することにより癌の転移を抑制する、請求項1又は2に記載の癌転移抑制剤。

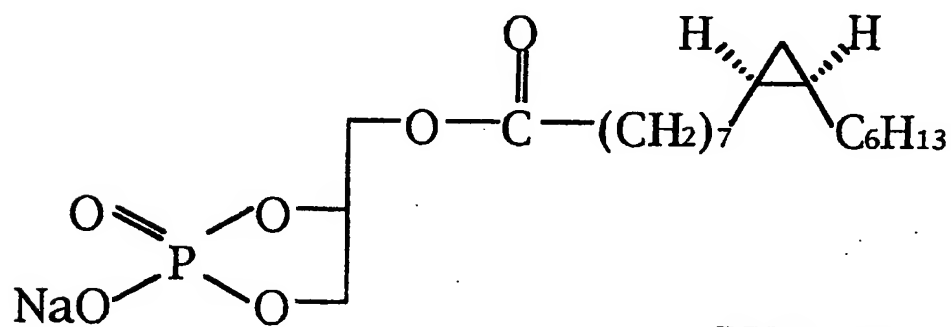
WO 02/094286

PCT/JP02/04839

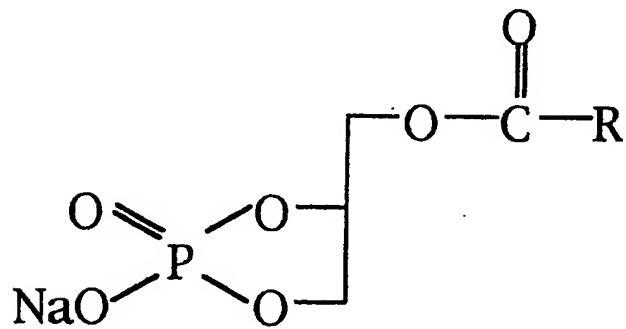
図 1



1-アシルLPA



PHYLPA

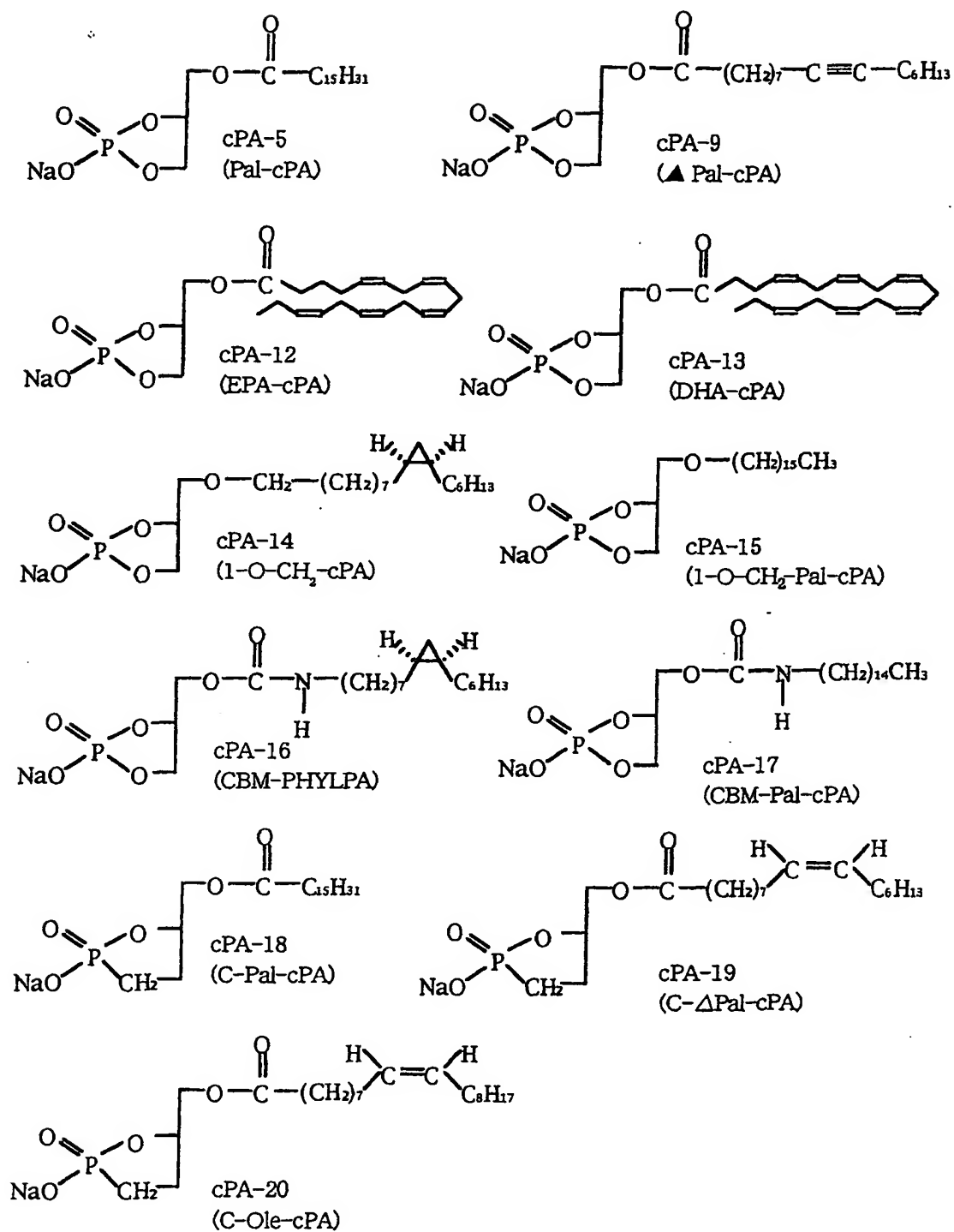


cPA

WO 02/094286

PCT/JP02/04839

2

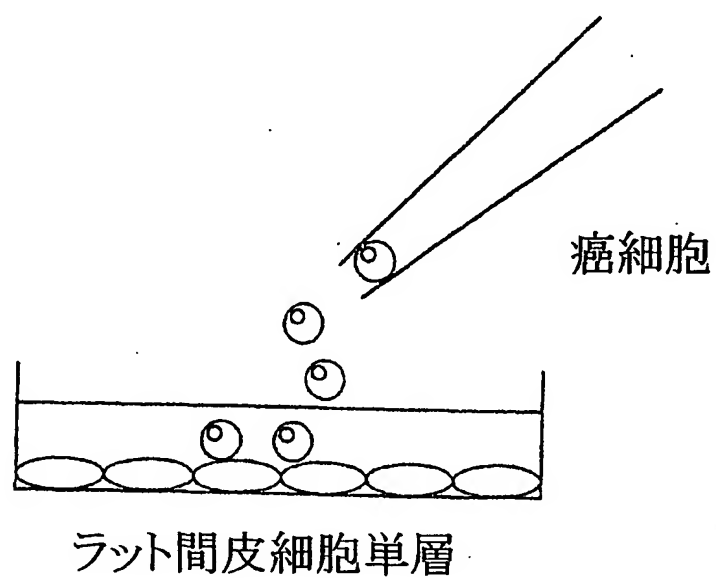


WO 02/094286

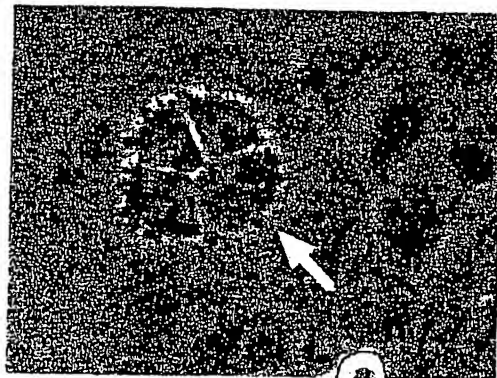
PCT/JP02/04839

図 3

(a)



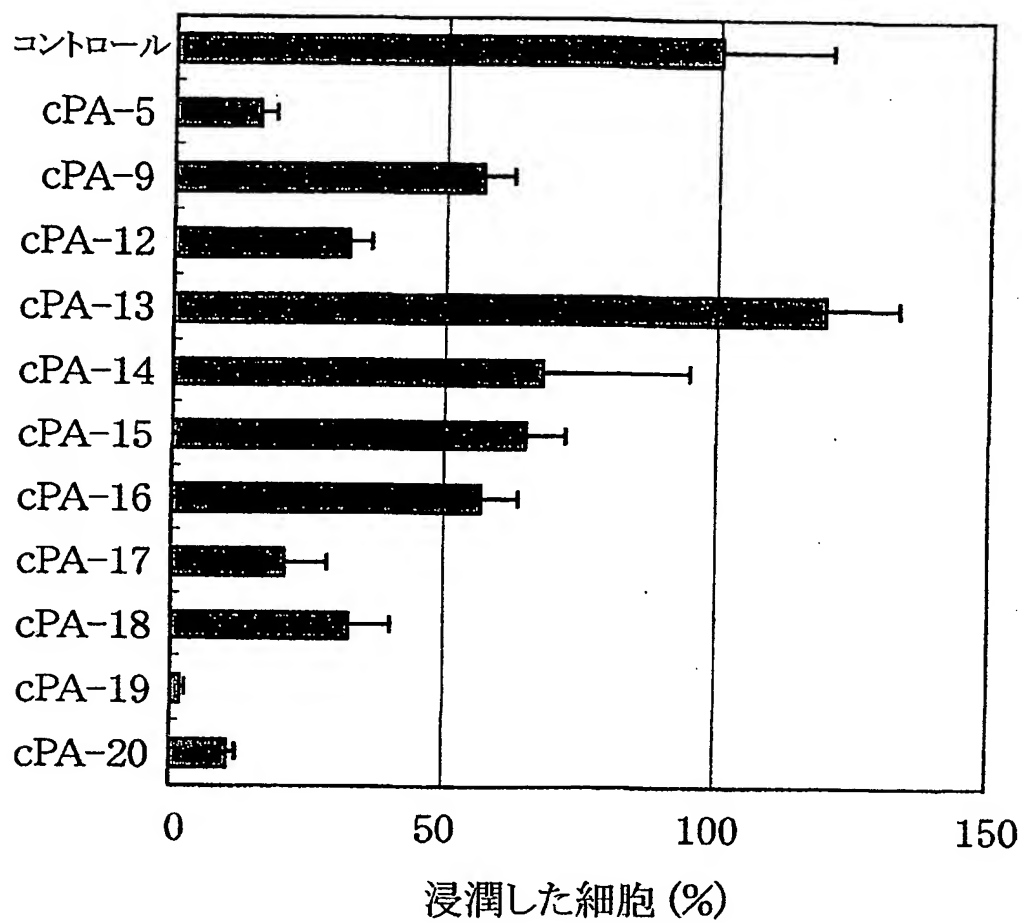
(b)



WO 02/094286

PCT/JP02/04839

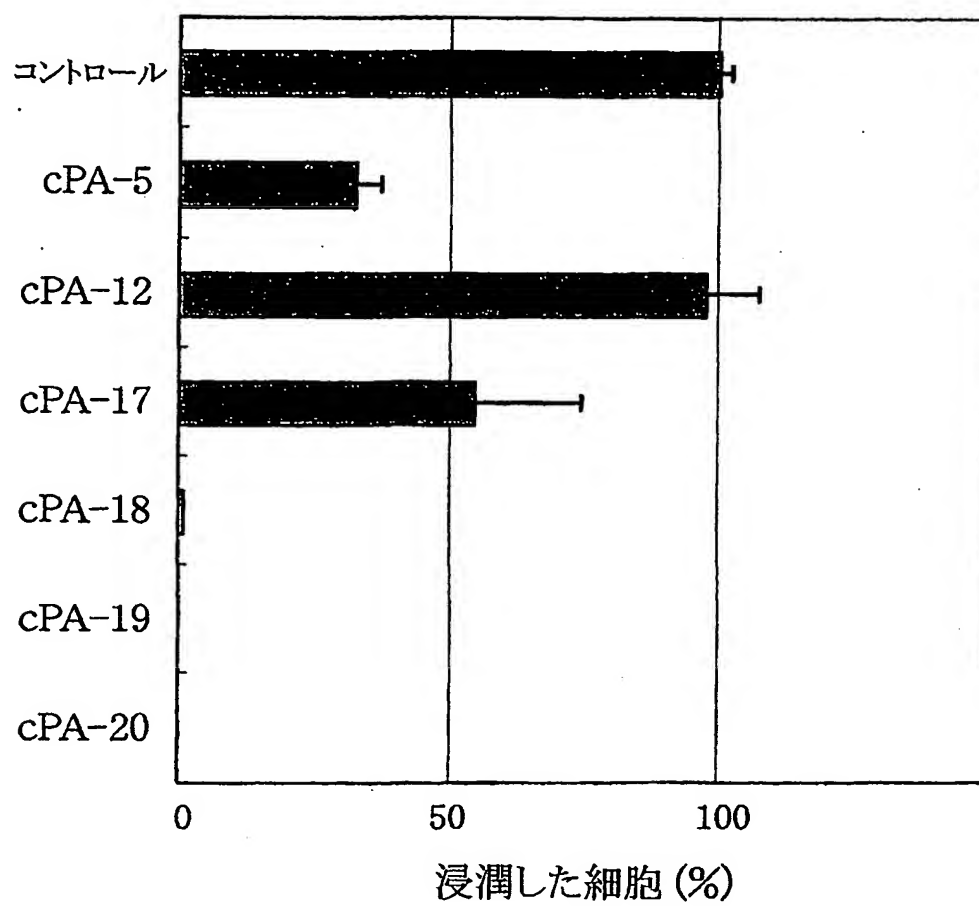
図 4



WO 02/094286

PCT/JP02/04839

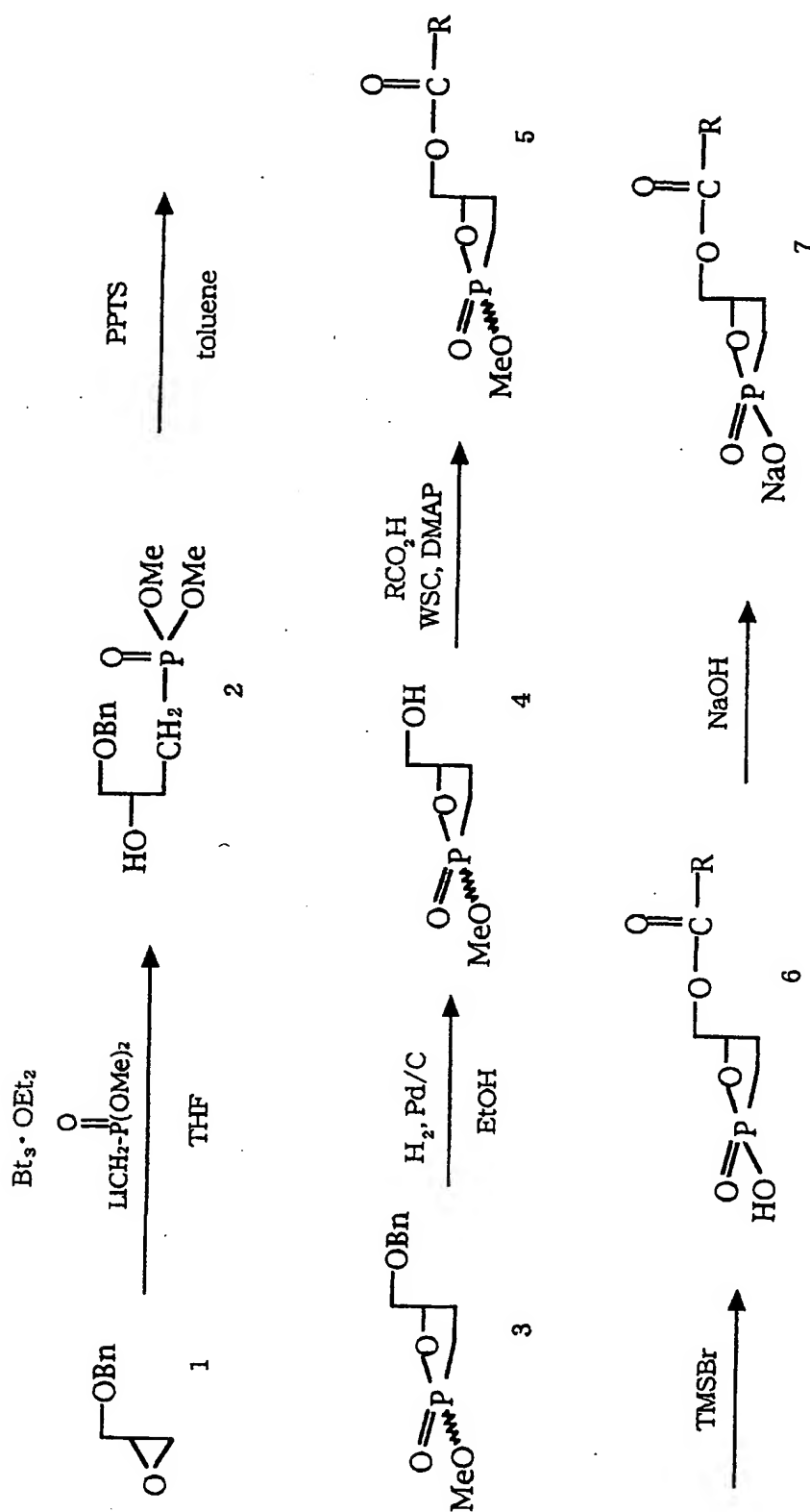
図 5



WO 02/094286

PCT/JP02/04839

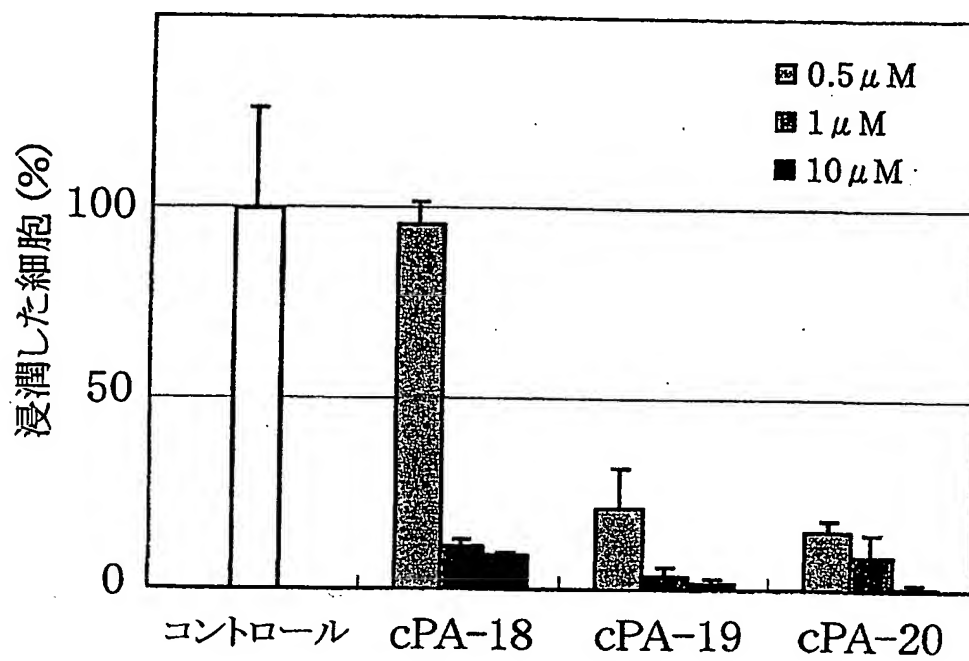
6



WO 02/094286

PCT/JP02/04839

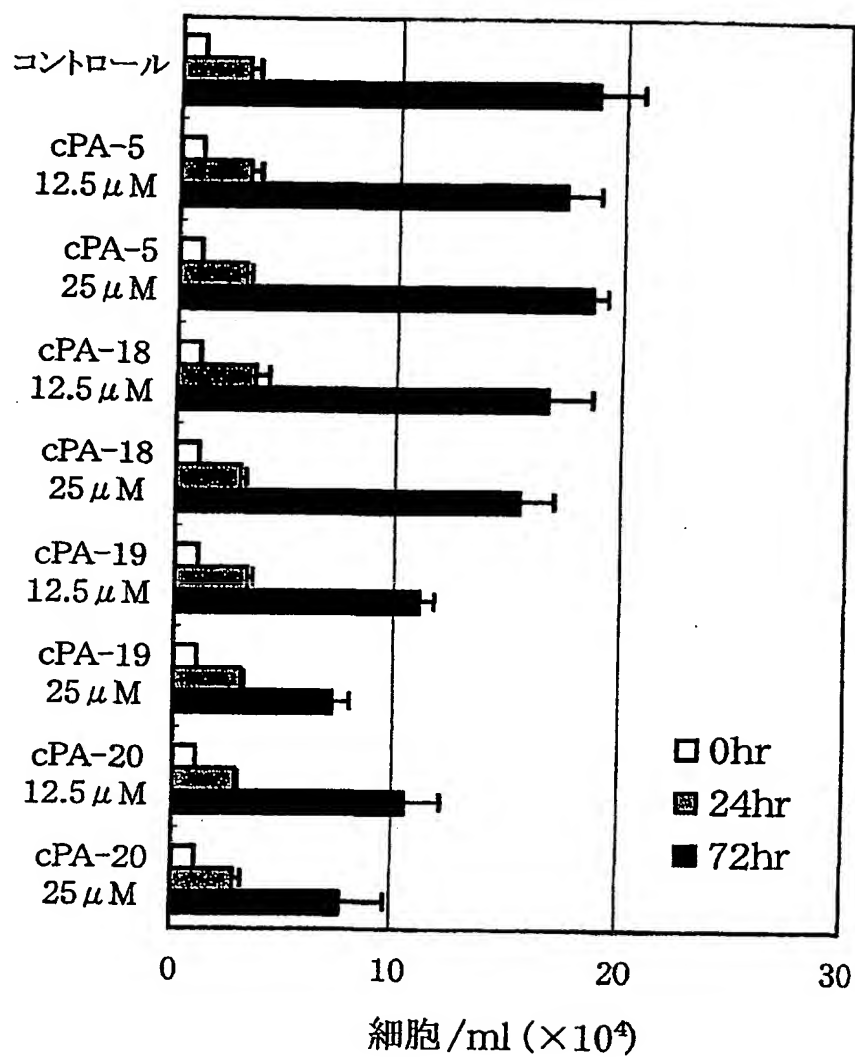
図 7



WO 02/094286

PCT/JP02/04839

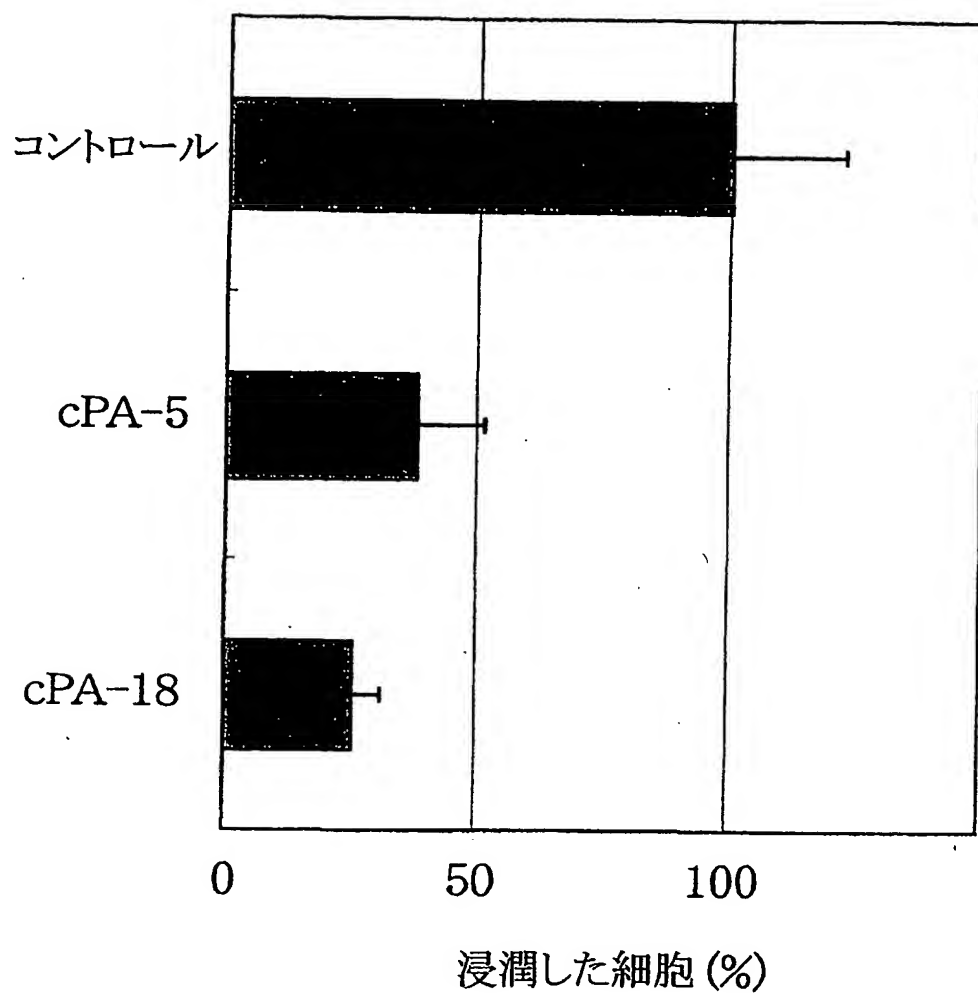
図 8



WO 02/094286

PCT/JP02/04839

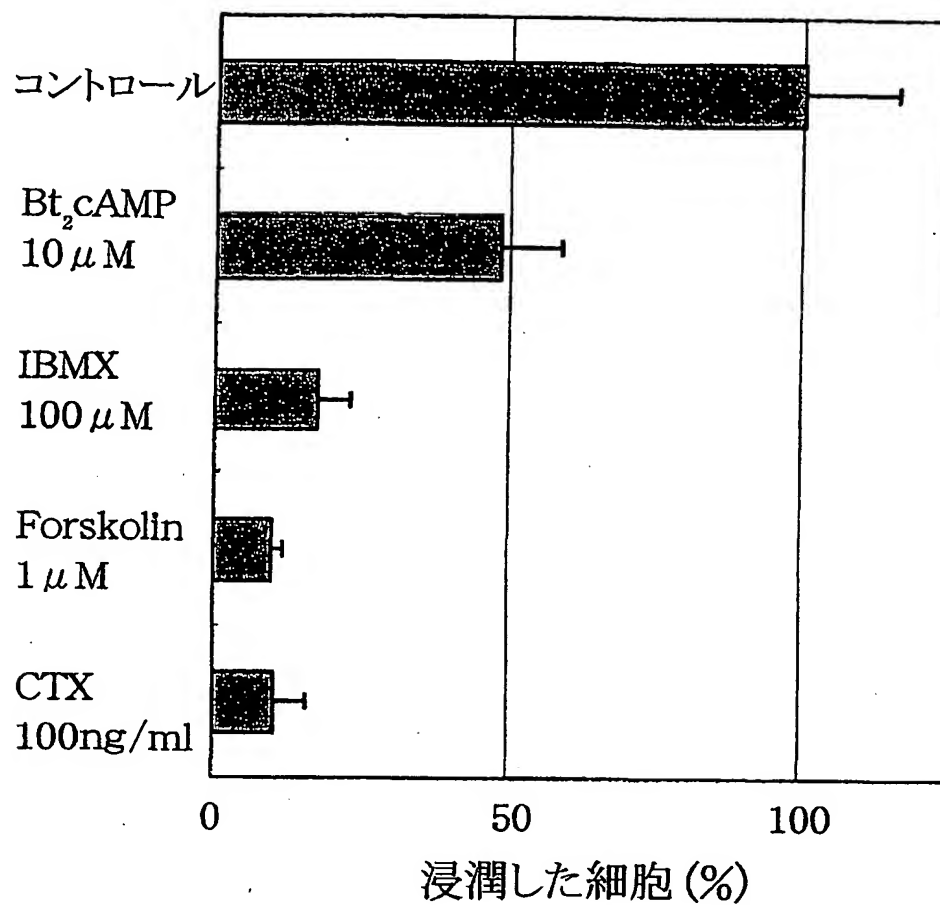
図 9



WO 02/094286

PCT/JP02/04839

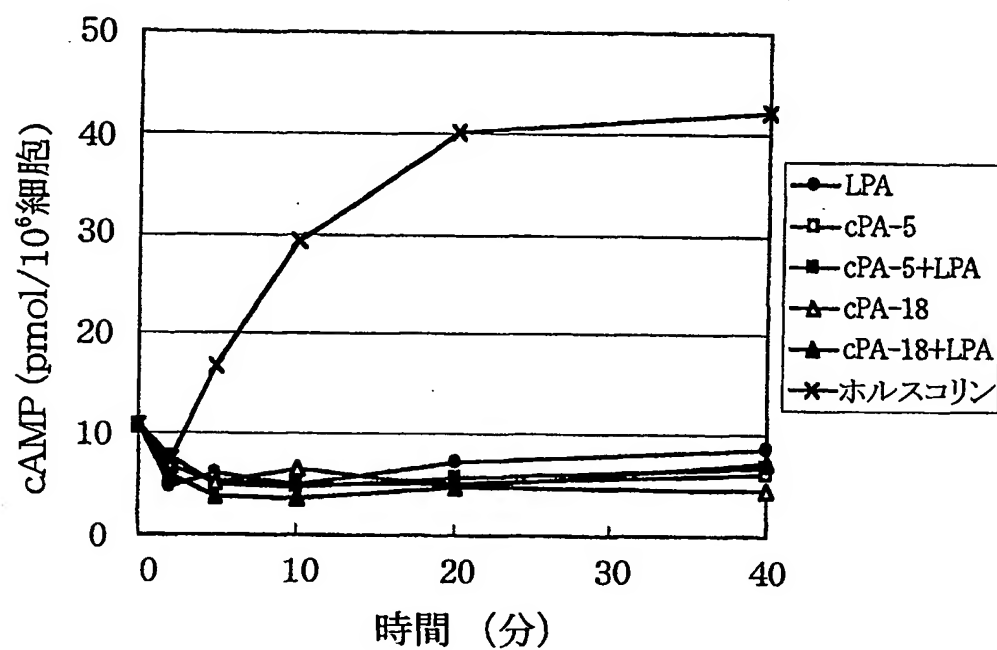
図 10



WO 02/094286

PCT/JP02/04839

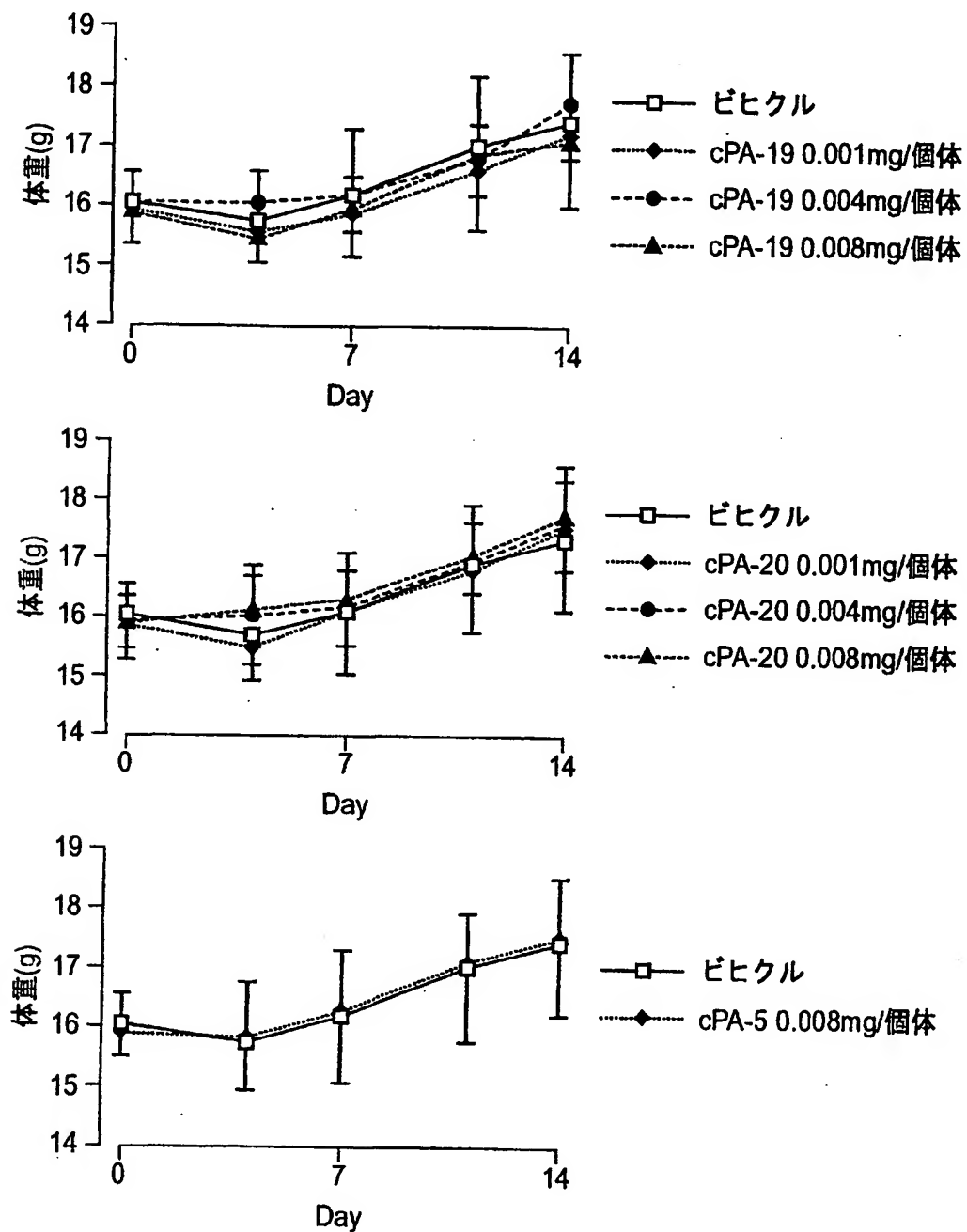
図 11



WO 02/094286

PCT/JP02/04839

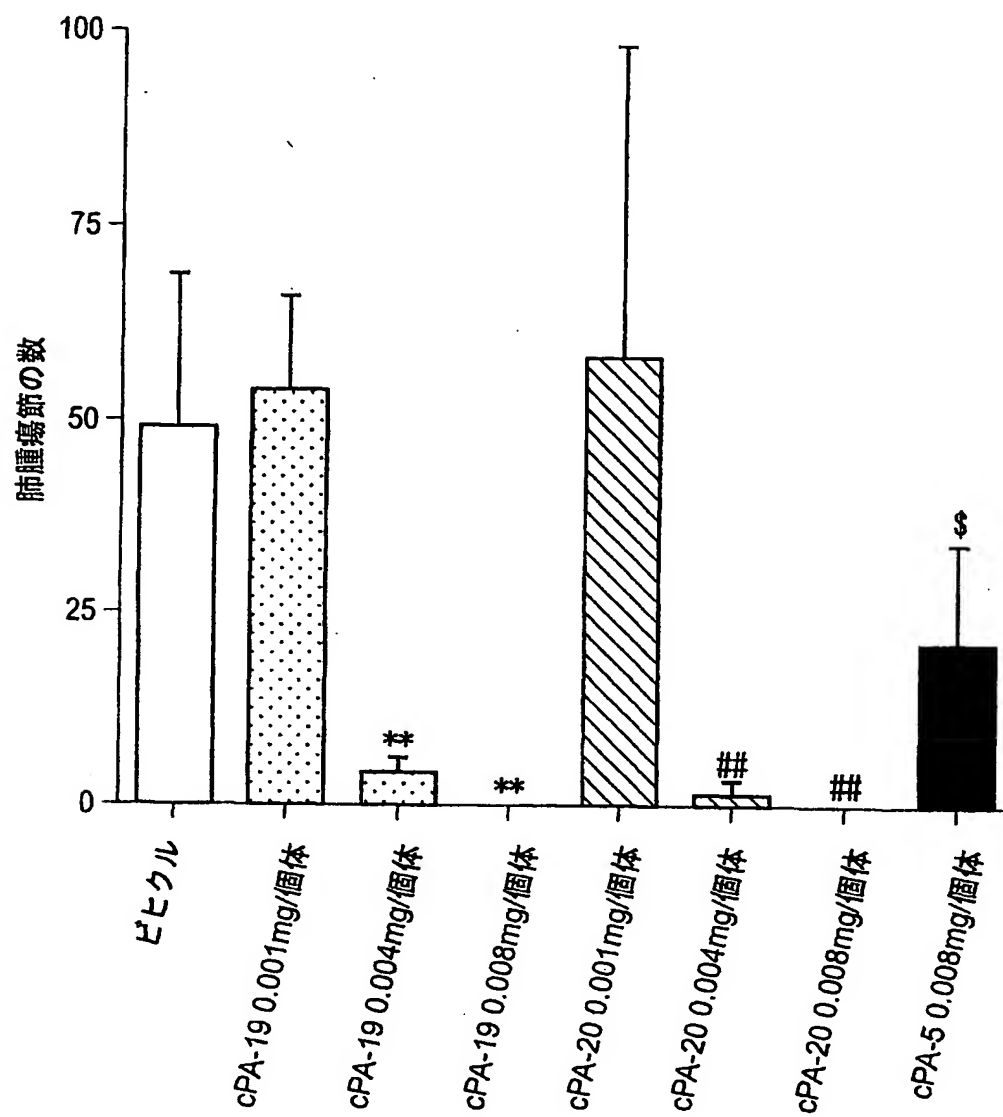
図 12



WO 02/094286

PCT/JP02/04839

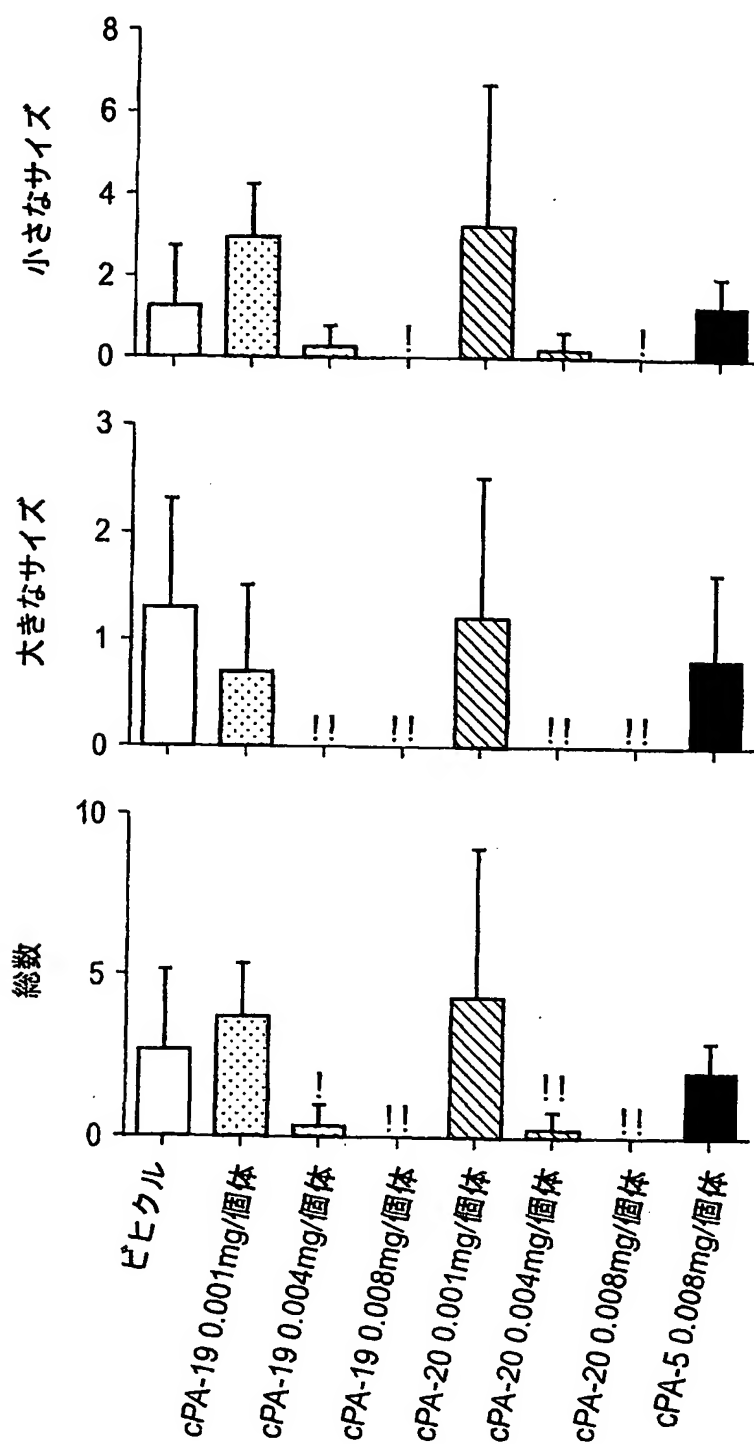
図 13



WO 02/094286

PCT/JP02/04839

図 14



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/04839

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/662, A61P35/04//C07F9/6574

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/662, A61P35/04//C07F9/6574

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAplus (STN), Registry (STN), JOISE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 9-25235 A (Sagami Chemical Research Center), 28 January, 1997 (28.01.97), Claims (Family: none)	1-3
A	JP 06-228169 A (Sagami Chemical Research Center), 16 August, 1994 (16.08.94), Claims; Par. No. [0001] (Family: none)	1-3
A	WO 00/57864 A (Yeda Research and Development Co., Ltd.), 05 October, 2000 (05.10.00), Page 34, III & AU 3451600 A & EP 1162979 A	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
30 July, 2002 (30.07.02)Date of mailing of the international search report
13 August, 2002 (13.08.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/04839

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YOKOMATSU Tsutomu, et al., Electrophilic heteroatom cyclization of ω -alkenylphosphonic acid half esters giving cyclic phosphonates (phostones),	1-3
A	Heterocycles, 1997, Vol.46, pages 463 to 472	1-3
A	Bestmann, Hans Juergen, et al., Phosphine alkynes. 50. On the structure of 2,2,2-triphenyl-1,2 λ 5-oxaphospholanes, Chemical Ber., 1992, Vol.0.125, No.1, p.225-9	1-3
	Chemical Abstracts, 1986, Vol.105, abstract No. 191524	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/04839										
<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int. Cl⁷ A61K31/662, A61P35/04 // C07F9/6574</p>												
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int. Cl⁷ A61K31/662, A61P35/04 // C07F9/6574</p>												
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p>												
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>CAplus (STN), Registry (STN), JOISE</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>JP 9-25235 A (財団法人相模中央化学研究所), 1997.01.28, 特許請求の範囲, (ファミリーなし)</td> <td>1-3</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 06-228169 A (財団法人相模中央化学研究所), 1994.08.16, 特許請求の範囲, 第0001欄, (ファミリーなし)</td> <td>1-3</td> </tr> </tbody> </table>				引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	A	JP 9-25235 A (財団法人相模中央化学研究所), 1997.01.28, 特許請求の範囲, (ファミリーなし)	1-3	A	JP 06-228169 A (財団法人相模中央化学研究所), 1994.08.16, 特許請求の範囲, 第0001欄, (ファミリーなし)	1-3
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号										
A	JP 9-25235 A (財団法人相模中央化学研究所), 1997.01.28, 特許請求の範囲, (ファミリーなし)	1-3										
A	JP 06-228169 A (財団法人相模中央化学研究所), 1994.08.16, 特許請求の範囲, 第0001欄, (ファミリーなし)	1-3										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>												
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>												
<p>国際調査を完了した日</p> <p>30, 07. 02</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p>13.08.02</p>										
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/JP) 、</p> <p>郵便番号100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>榊原 貴子</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3451</p>										

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP02/04839

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 00/57864 A (Yeda research and development co. ltd.) 2000.10.05, 第34頁 III & AU 3451600 A & EP 1162979 A	1-3
A.	Yokomatsu Tsutomu, et.al., Electrophilic heteroatom cyclization of ω -alkenylphosphonic acid half esters giving cyclic phosphonates (phostones), Heterocycles, 1997, vol.46, p.463-472,	1-3
A	Bestmann, Hans Juergen, et al., Phosphine alkylenes. 50. On the structure of 2,2,2-triphenyl -1,2 λ 5-oxaphospholanes, Chemical Ber., 1992, vol.125, no.1, p.225-9.	1-3
A	Chemical Abstracts, 1986, vol.105, abstract no.191524	1-3